

# **Untersuchung zur Wirkung und Wirkmechanismus von NHE-1-Inhibitoren auf die Hypertrophie adulter Rattenkardiomyozyten**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich  
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften



von Kerstin Klämbt  
aus Bremen

Frankfurt am Main, 2005

(DF1)

vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

Gutachter: Prof. Dr. Dieter Steinhilber, Prof. Dr. Andreas E. Busch

Datum der Disputation: **13.Mai 2005**

Nichts auf der Welt ist so mächtig, wie eine Idee deren Zeit gekommen ist.  
(Mark Twain)

meinen Eltern gewidmet

I Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>II</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Myokardiale Hypertrophie und Herzinsuffizienz	1
1.2	Zellkulturmodelle zur Untersuchung der myokardialen Hypertrophie	4
1.3	Allgemeine Signaltransduktion myokardialer Hypertrophie	6
1.4	Die Rolle adrenerger Rezeptoren bei der Hypertrophie	9
1.5	Natrium-Protonen-Austauscher	10
1.6	Natrium-Protonen-Austauscher-Inhibitoren	11
1.7	Spezifische Rolle des NHE-1 im Myokard	12
1.8	Aufgabenstellung	17
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>18</b>
2.1	Chemikalien & Enzyme	18
2.2	Laborgeräte & Verbrauchsmaterial	21
2.3	Medien, Puffer & Lösungen	22
2.4	Isolierung adulter Kardiomyozyten der Ratte	24
2.5	Zellkultivierung	25
2.6	Biochemische und zellbiologische Methoden zur Bestimmung der Hypertrophie	26
2.6.1	Hypertrophieparameter	26
2.6.2	Ermittlung der Zellgröße	26
2.6.3	Bestimmung der Protein-Neusynthese anhand der Inkorporation von L-[ <sup>14</sup> C]-Pheylalanin	27
2.6.4	Bestimmung der RNA-Neusynthese anhand der Inkorporation von [ <sup>14</sup> C]-Uridin	28
2.6.5	Bestimmung des DNA-Gehaltes	29
2.7	Proteinchemische Methoden	30
2.7.1	Zellulärer Aufschluss	30
2.7.2	Membranpräparationen aus adulten Rattenkardiomyozyten	30
2.7.3	Proteinbestimmung nach Lowry	31

2.7.4	Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	31
2.7.5	Western Blot	33
2.7.6	Elektrotransfer	33
2.7.7	Immunochemischer Nachweis durch Antikörperbindung an elektrotransferierte Proteine	34
2.8	Messung von intrazellulärem Calcium	36
2.9	Molekularbiologische Methoden	37
2.9.1	Genexpressionsbestimmung	37
2.9.2	Präparative RNA-Isolierung	37
2.9.3	Entfernung genomischer DNA	38
2.9.4	Reverse Transkription	38
2.9.5	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	39
2.9.6	Auswahl spezifischer Primer für die Echt-Zeit-PCR	41
2.9.7	Quantitative Echt-Zeit-PCR	42
2.9.8	Auswertung der Echt-Zeit-PCR	44
2.9.9	cRNA-Synthese, DNA-Microchip-Hybridisierung und Datenanalyse	45
2.10	Allgemeine molekularbiologische Methoden	47
2.10.1	Agarose-Gelelektrophorese	47
2.10.2	Gelextraktion und Klonierung in einen Sequenzierungsvektor	47
2.10.3	DNA-Restriktion	48
2.10.4	Photometrische Analyse der DNA	48
2.10.5	Sequenzanalyse der DNA	48
2.11	Auswertung, Statistik und graphische Bildbearbeitung	48
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>50</b>
3.1	Überexpression des NHE-1-Proteins in $\beta_1$ -transgenen Mäusen	50
3.2	Validierung der $\alpha_1$ -adrenerg vermittelten Hypertrophie-Induktion im <i>in vitro</i> Modell isolierter Kardiomyozyten	51
3.2.1	$\alpha_1$ -adrenerg induzierte RNA-Neusynthese und Proteinbiosynthese	51
3.2.2	$\alpha_1$ -adrenerg vermittelte Zunahme von Zellvolumen und Zellquerschnittsfläche	53
3.2.3	Genetische Marker myokardialer Hypertrophie	54

3.3	Hemmung der $\alpha_1$ -adrenerg vermittelten Hypertrophie-Induktion in isolierten Kardiomyozyten spezifische NHE-1-Inhibitoren	55
3.3.1	Wirkung von Cariporide	55
3.3.2	Klasseneffekt von NHE-1-Inhibitoren	57
3.3.3	Effekte der NHE-1-Hemmung durch Cariporide auf andere Hypertrophie-Stimuli	59
3.3.3.1	Effekte der NHE-1-Hemmung auf $\beta$ -adrenerge Stimulation	59
3.3.3.2	Effekte der NHE-1-Inhibition auf Insulin- bzw. PMA-Stimulation	60
3.4	Effekt des Natrium-Calcium-Austauscher-Inhibitors SEA0400	62
3.4.1	Effekt von SEA0400 auf Hypertrophie-Parameter nach $\alpha_1$ -Adrenozeptor-Stimulation	62
3.4.2	Wirknachweis von SEA0400 auf adulte Kardiomyozyten	65
3.5	Wirkung von NHE-1-Inhibitoren auf die Phosphorylierung verschiedener, bekannter intrazellulärer Kinasen der Hypertrophie	69
3.5.1	Aktivierung und Rolle der ERK nach $\alpha_1$ -Adrenorezeptor-Stimulation	69
3.5.2	Einfluss auf die Phosphorylierung der p90 <sup>RS</sup> -Kinase	72
3.5.3	Einfluss auf die Phosphorylierung des ribosomalen S6 Proteins	74
3.5.4	Einfluss auf die Protein Kinase C	76
3.6	DNA-Microchip-Assay	79
3.7	Verifizierung differenziell regulierter Gene der DNA-Microchip-Experimente	85
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>88</b>
4.1	Relevanz des Modells im Hinblick auf die Fragestellung	89
4.2	Einfluss von Cariporide auf die untersuchten Hypertrophie-Parameter	90
4.3	Untersuchungen zum Wirkmechanismus von NHE-1-Inhibitoren in der Kardiomyozyten-Hypertrophie	93
4.4	Wirkung der NHE-1-Inhibition auf die Genexpression in adulten Rattenkardiomyozyten	99
4.5	Abschließende Betrachtung	103
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>106</b>

<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>108</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>109</b>
<b>8</b>	<b>Veröffentlichungen</b>	<b>125</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung</b>	<b>126</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>127</b>

## **II Abkürzungsverzeichnis**

Bidest.	bidestilliertes Wasser
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin ( bovine serum albumin)
bzw.	beziehungsweise
Cariporide	HOE642
cDNA	komplementäre DNA
cRNA	komplementäre / antisense RNA
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphat
dpm	Zerfallereignisse pro Minute
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGR-1	Early growth response gene-1
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
ERK	Extracellular signal regulated kinase
Fa.	Firma
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-2-ethansulfonsäure
IU	Internationale Einheit
kB	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MEK-1	Mitogen Activated ERK activating kinase
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MW	Molekulargewicht
n	Anzahl der durchgeführten Experimente
NCX	Natrium-Calcium Austauscher
Oligo-dT <sub>(15)</sub>	oligo-Desoxy-Thymidin (15 Nukleotide)
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p70 S6K	p70-Isoform der ribosomalen S6-Kinase
p90 <sup>RSK</sup>	p90 Ribosomale Kinase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PD	PD98059
PE	Phenylephrin
PI-3-Kinase	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B (auch Akt genannt)
PKC	Proteinkinase C



PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
RNase	Ribonuklease
ROCK1	160kDa Rho-assoziierte Kinase
RT	Reverse Transkription
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Lösung
TBS	Trisgepufferte Kochsalzlösung
TBST	Trisgepufferte Kochsalzlösung versetzt mit TWEEN-20
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Hydroxymethylaminomethan
Triton-X-100	t-Octylphenoxyethanol
U	Unit (Enzymeinheit)
UV	Ultraviolett
vs.	versus/ gegen
WT	Wildtyp
µl	Mikroliter
xg	x-fache Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtprozent
$[Ca^{2+}]_i$	Intrazelluläres Calcium
$^{14}C$ -Phe	$[^{14}C]$ -Phenylalanin
$^{14}C$ -Uri	$[^{14}C]$ -Uridin

## **1 Einleitung**

### **1.1 Myokardiale Hypertrophie und Herzinsuffizienz**

*„Die myokardiale Hypertrophie ist ein früher Meilenstein in der Entwicklung einer Herzinsuffizienz und somit ein Risikofaktor“ (HUNTER & CHIEN, 1999).*

Nach einer initialen myokardialen Schädigung oder auch bei chronischen Belastungen, z.B. bei einer arteriellen Hypertonie, kommt es zunächst kompensatorisch zu einer Myozytenhypertrophie mit Zunahme der Myokardmasse (COHN ET AL., 2000). Hierbei verändern sich sowohl die Dimensionen des Herzens als auch die Form des betroffenen Ventrikels, ein adaptiver Prozess, der als *Remodelling* bezeichnet wird (BAID ET AL., 1998). Das Herz als „zellkonstantes Organ“ mit Herzmuskelzellen, die als terminal differenzierte Zellen keine Mitose mehr durchlaufen können (LINZBACH, 1974, PASUMARTHI & FIELD, 2002), kann unter bestimmten Umständen eine Hypertrophie entwickeln, die durch die Zunahme des Zellvolumens der Herzmuskelzellen bei gleich bleibender Zellzahl gekennzeichnet ist. Die Hypertrophie grenzt sich damit gegenüber der Hyperplasie ab, die als Größenzunahme eines Organs oder Gewebes durch Vermehrung der spezifischen Organzellen definiert ist.

Kausale Faktoren für die Hypertrophie sind neben dem Verlust kontraktile Elemente, z.B. durch das Absterben von Kardiomyozyten nach einem Myokardinfarkt, auch die mechanische Dehnung des Myokardgewebes („*mechanical stress*“; SADOSHIMA ET AL., 1992). Eine neurohumorale Aktivierung sowie verschiedene trophische Faktoren (PARKER ET AL., 1990) sind zusätzlich für eine Fibrosierung des Herzgewebes verantwortlich (BAID ET AL., 1998). Ältere Studien belegen, dass diese ursächlichen Faktoren möglicherweise konzentriert zu einer Myokardhypertrophie führen können. Die Entstehung einer myokardialen Hypertrophie mittels hämodynamischer Faktoren scheint demnach durch lokale neurohumorale Faktoren unterstützt zu sein (KOMURO ET AL., 1990; YAMAZAKI ET AL., 1995; 1996). So kann zunächst ein Anstieg der myokardialen Wandspannung kompensiert werden, also die Belastung der einzelnen Herzmuskelfasern reduziert bzw. normalisiert werden (ANVERSA ET AL., 1996) und damit die Kontraktilität erhalten bleiben (PFEFFER ET AL., 1990). Daher kann die Hypertrophie initial zunächst auch als kompensatorischer Mechanismus eingestuft werden, als Reaktion des Herzens auf Bluthochdruck, Stressfaktoren und mechanische Überbelastung.

Die Annahme, dass Katecholamine an der Entstehung und dem Fortschreiten der myokardialen Hypertrophie *in vivo* beteiligt sein könnten, entstand dadurch, dass die kardiale

Hypertrophie mit erhöhten Plasmakonzentrationen an Katecholaminen einhergeht (MORGAN & BAKER, 1991; BURGAISKY ET AL., 1992).

Bei Patienten mit Herzinsuffizienz kommt es frühzeitig und bereits in Ruhe zu einer zwei- bis dreifachen Erhöhung der Sympathikusaktivität (BÖHM, 2002). Diese Aktivierung des sympathischen Nervensystems erfolgt über sog. Barorezeptoren, die Druck-, Volumen- oder Frequenzveränderungen in großen Gefäßen oder im Herzen wahrnehmen und an das zentrale Nervensystem mitteilen. Durch den reaktiv erhöhten Katecholaminspiegel erfolgt eine Überstimulation der kardiovaskulären sympathischen Rezeptoren und folgenden Effekten: gesteigerte myokardiale Kontraktilität, Tachykardie, arterielle und venöse Vasokonstriktion, mit konsekutiv erhöhter kardialer Nach- und Vorlast (SCHRIER ET AL., 1999). Dieser Mechanismus kann zunächst ebenfalls die Insuffizienz kompensieren, jedoch trägt er längerfristig zum Voranschreiten der Krankheit bei. Es ist bekannt, dass eine andauernde Stimulation von  $\beta_1$ -Adrenozeptoren eine Apoptose von Myokardzellen induziert (COMMUNAL ET AL., 1999). Des weiteren wird die exzessive sympathische Aktivität mit Hypertrophie und fokaler myokardialer Nekrose assoziiert (JACKSON ET AL., 2000). Untersuchungen *in vivo* belegen zudem, dass die Stimulation von kardialen Adrenozeptoren auch unabhängig von hämodynamischen Effekten zu einer Myokardhypertrophie führen kann (ZIERHUT & ZIMMER, 1989). Vor allem aber sind es die o.a. Effekte der andauernden sympathischen Aktivierung, die zu Minderversorgungen und zusätzlichen Belastungen des Myokards führen. Insgesamt fördert somit dieser eigentliche Kompensationsmechanismus die Progression der Herzinsuffizienz (ABRAHAM, 2000).

Die Konsequenzen der genannten zunächst kompensatorischen Prozesse führen demnach in einen Circulus vitiosus, da die Vorgänge nicht mit einer Angiogenese einhergehen, die zu einer verbesserten Versorgung des Myokards mit Sauerstoff und Substraten führen würde. Durch die Unterversorgung kommt es zu lokalen Ischämien und erhöhtem Sauerstoffbedarf. Zudem führt die Fibrosierung des Gewebes zu reduzierter Kapillargefäßdichte, verschlechterter Kontraktilität und herabgesetzter diastolischer Dehnbarkeit des Ventrikels (BAID ET AL., 1998). Ebenso ist ein Merkmal dieses Prozesses der Verlust von Kardiomyozyten durch apoptotische und/ oder nekrotische Vorgänge (BELTRAMI ET AL., 1995; KAJSTURA ET AL., 1997); dies fördert zusätzlich den Verlust der Kontraktilität.

Letztendlich befindet sich das Herz in einem Zustand, in dem die bekannten Kompensationsmechanismen wie Herzfrequenz, Kontraktilität und Schlagvolumen sowie Blutdruckregulation nicht mehr zur Aufrechterhaltung einer, für den Körper notwendigen Blutversorgung ausreichen (Herzinsuffizienz) (DENOLIN ET AL., 1983). Damit ist die

myokardiale Hypertrophie ein erster Indikator für eine sich später entwickelnde chronische Herzinsuffizienz und erhöhte Mortalität (LEVY ET AL., 1990).

Je nach Schweregrad wird die Herzinsuffizienz nach den Kriterien der *New York Heart Association* (1964) anhand anamnestischer und einfacher klinischer Kriterien in vier Klassen eingeteilt (NYHA I-IV):

- I. Herzerkrankung ohne körperliche Einschränkung. Alltägliche körperliche Belastung verursacht keine Beschwerden.
- II. Herzerkrankung mit leichter Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit. Keine Beschwerden in Ruhe. Stärkere körperliche Belastung ruft Beschwerden hervor.
- III. Herzerkrankung mit höhergradiger Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit. Keine Beschwerden in Ruhe. Geringe körperliche Belastung löst Beschwerden aus.
- IV. Herzerkrankung mit Beschwerden bei allen körperlichen Aktivitäten und in Ruhe. Bettlägerigkeit.

Die bisherige Herzinsuffizienz-Therapie hat das Ziel, neben der Prävention des Auftretens und des weiteren Fortschreitens der Erkrankung, eine Verbesserung der Lebensqualität sowie eine Lebensverlängerung zu erzeugen. Dies ist mit den heute zur Verfügung stehenden Therapiestrategien zwar zu erreichen, bedarf jedoch einer fortwährenden Ergänzung mit neuen Therapieansätzen, um die nach wie vor hohe 5-Jahres-Mortalitätsrate der Herzinsuffizienz von ca. 41% weiter zu senken (Stewart et al., 2001).

Zur Basistherapie der Herzinsuffizienz-Therapie gehören Digitalis-Präparate, Diuretika und ACE-Hemmer (Gheorghiade et al., 1998) und die  $\beta$ -Rezeptorenblocker. Digitalis-Präparate wirken positiv inotrop, senken die Herzfrequenz und vermindern eine neurohumorale Aktivierung in der Herzinsuffizienz (Gheorghiade et al., 1995). Diuretika sind bei jeder Herzinsuffizienz mit Zeichen einer Flüssigkeitsretention (z.B. Ödeme, Lungenstauung) indiziert (Remme et al., 2001).

In kontrollierten Studien konnte belegt werden, dass additiv zu einer ACE-Hemmer-Basismedikation im NYHA-Stadium II-IV eine vorsichtig eingeleitete  $\beta$ -Blocker-Therapie sicher ist und zu einer Verbesserung der linksventrikulären Pumpfunktion führt (CIBIS-II Investigators, 1999; Packer et al., 2001). ACE-Hemmer wurden ursprünglich als Therapeutika des Bluthochdrucks entwickelt. Seit der initialen Applikation wurden jedoch einige zusätzliche klinische Indikationen festgestellt (Brown et al., 1998).

Ihr Wirkmechanismus besteht darin, dass sie das Angiotensin-Konversions- Enzym (ACE), das die Umwandlung von Angiotensin I in Angiotensin II katalysiert, kompetitiv hemmen. Gleichzeitig wird durch dieses Enzym der Abbau des lokalen vasodilatatorischen Bradykinin gehemmt und die Prostazyklinsynthese stimuliert (Erdos, 1977). Eine Hemmung des Enzyms beinhaltet daher eine doppelte Wirkung, nämlich die Abschwächung der Wirkung des Vasokonstriktors Angiotensin II und die Verstärkung der Wirkung des Vasodilatators Bradykinin. Somit ergibt sich die Blutdrucksenkung und konsekutiv die Senkung der Vor- und Nachlast des Herzens als Hauptwirkung der ACE-Hemmer. Hieraus ergibt sich letztendlich eine Erhöhung der kardialen Auswurffraktion und Leistung ohne einen Anstieg der Herzfrequenz (Brown et al., 1998). Neben diesen humoralen Wirkungen hat sich in den letzten Jahren eine Wirkung auf die gewebeständigen Renin-Angiotensin-Systeme bestätigt. Diese spielen eine wichtige kausale Rolle für den Prozess des Remodelling nach Myokardinfarkt und auch für die Progression der Herzinsuffizienz (Dzau et al., 1994). Die bestehenden Herzinsuffizienz-Therapien aus ACE-Hemmer,  $\beta$ -Blocker und Diuretika greifen in den Prozess der myokardialen Hypertrophie zum überwiegenden Teil nur indirekt ein. Sie richten sich vielmehr gegen die Folgen einer im Laufe der Erkrankung einsetzenden neurohumoralen Aktivierung des gesamten Herz-Kreislauf-Systems und der Niere. Diverse molekulare Antworten wurden im Zusammenhang mit der myokardialen Hypertrophie beschrieben, aber Auslöser, zugrundeliegende Mechanismen und exprimierte Gene sind im Detail weitestgehend noch nicht verstanden (JOHNATTY ET AL., 2000).

## **1.2 Zellkulturmodelle zur Untersuchung der myokardialen Hypertrophie**

Die der Hypertrophie zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen lassen sich mit Hilfe verschiedener Herzinsuffizienz-Modelle, u.a. in der Ratte untersuchen (PFEFFER ET AL., 1979; GOLDMANN & RAYA, 1995). Die dabei auftretenden Veränderungen sind denen eines Patienten nach einem Herzinfarkt sehr ähnlich. Um die komplexen systemischen und hämodynamischen Interaktionen *in vivo* zu umgehen, wurden jedoch bereits früh vereinfachte Zellkulturmodelle mit isolierten Kardiomyozyten entwickelt (SIMPSON ET AL., 1982). Diese Zellkulturmodelle ermöglichen, neurohumorale Faktoren unabhängig von ihren hämodynamischen Eigenschaften in bezug auf ihre Hypertrophie-induzierende Wirkung zu untersuchen. Solche Modelle haben zudem den Vorteil, dass die Zellen von definierten Kulturmedien und Wirkstoff-Konzentrationen umgeben sind. Ferner ist es möglich eine Hypertrophie-Antwort direkt dem kultivierten Zelltyp zuzuordnen.

Wie bereits erwähnt, erfolgt nach einem Hypertrophie-Stimulus eine Größenzunahme der Kardiomyozyten, wobei das Verhältnis von Proteinbiosynthese und Proteindegradation zugunsten der Synthese verschoben ist (SIMPSON 1983; 1985). Die Vergrößerung der Kardiomyozyten geht mit einem erhöhten zellulärem *messenger*RNA (mRNA), ribosomale RNA (rRNA)- und Protein-Gehalt einher (SUGDEN & CLERK, 1998; YAMAZAKI ET AL., 1998), so dass deshalb die Hypertrophie in Zellkulturmodellen auch durch folgende Parameter definiert wird, die jedoch nicht unbedingt gleichzeitig auftreten müssen:

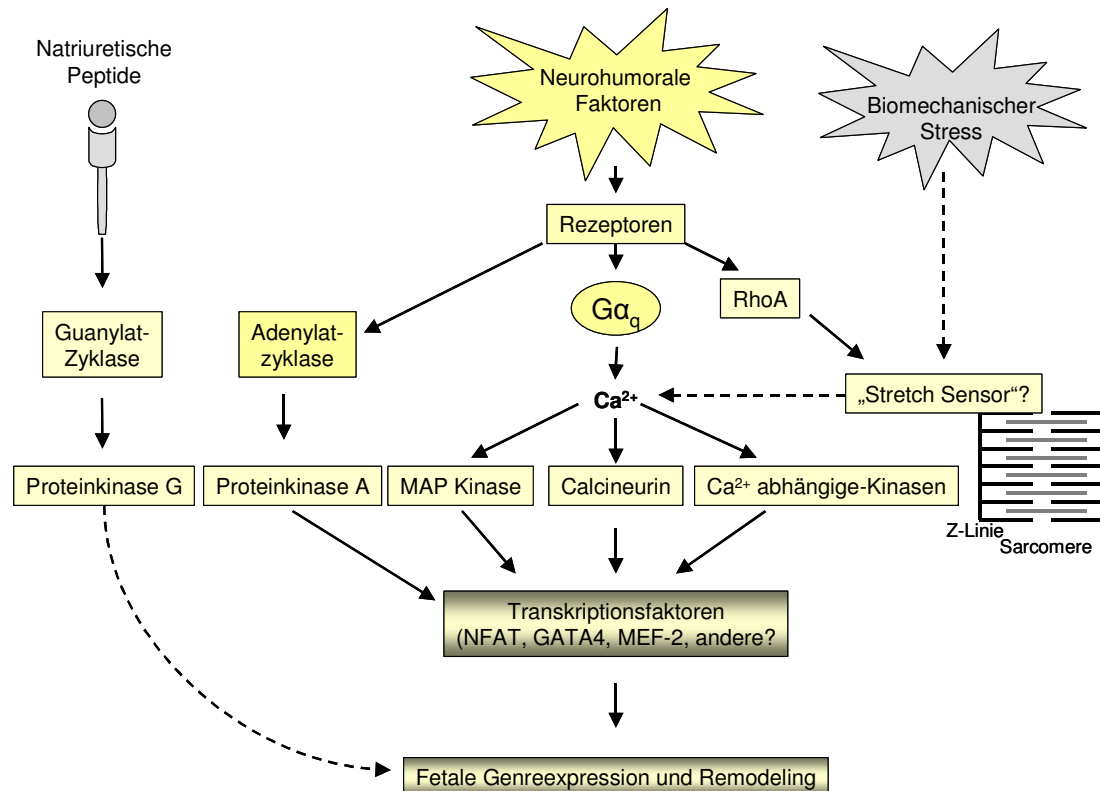
- 1.) Zunahme des zellulären Gesamtproteingehaltes (MCDERMOTT & MORGAN, 1989)
- 2.) Zunahme des myofibrillären Protein-Kompartiments (WASPE ET AL., 1990)
- 3.) Zunahme der Proteinsyntheserate (MCDERMOTT & MORGAN, 1989)
- 4.) Erhöhung des zellulären RNA-Gehaltes, der sich zu 85% aus ribosomaler RNA zusammensetzt und damit ein Maß für die Translationskapazität isolierter Kardiomyozyten ist (*RNA-De-novo-Synthese*) (ALLO ET AL., 1992)
- 5.) Die Reexpression fötaler Protein-Isoformen wie die  $\beta$ -Isoform der schweren Kette des Myosins ( $\beta$ -MHC) (SCHLÜTER & PIPER, 1992; HANNAN ET AL., 2003) und des fetalen Kreatinkinase-BB-Isoenzym (SCHLÜTER ET AL., 2000)
- 6.) Die verstärkte Expression des nukleären Protoonkogenes *c-myc* (POLLACK ET AL., 1994)

Die Größenzunahme der Kardiomyozyten (Volumen-und Querschnittsfläche) sowie die Zunahme des zellulären RNA- und Protein-Gehaltes ist in einem quantitativ vergleichbaren Maß erhöht (BELL ET AL., 1995) wie auch in Biopsien aus hypertrophiertem, humanen Herzmuskelgewebe gezeigt werden konnte (DEL MONTE ET AL., 1995). Die genannten Parameter lassen sich in Zellkulturmodellen isolierter Kardiomyozyten adulter Tiere auf die *in vivo*-Situation simulieren.

Ein Großteil des gegenwärtigen Wissens zur Entstehung einer Myokardzell-Hypertrophie stammt aus Untersuchungen an neonatalen Kardiomyozytenkulturen. In diesem Modellsystem können ebenfalls Hypertrophie-Reaktionen durch eine Vielzahl extrazellulärer Signalmoleküle hervorgerufen werden. Der Vorteil dieses Zellkulturmodells liegt zum einen in der einfacheren Isolation neonataler Kardiomyozyten im Vergleich zu adulten. Zum anderen unterlaufen neonatale Rattenkardiomyozyten noch Mitosen, so dass sich die Kardiomyozyten nach der Isolation aus dem Herzverbund auch unter Kulturbedingungen weiter teilen und einen konfluenten Zellrasen bilden können (KASTEN, 1972).

### 1.3 Allgemeine Signaltransduktion myokardialer Hypertrophie

Das gegenwärtige Bild zur Signaltransduktion der adrenerg vermittelten Hypertrophie beruht zu großen Anteilen auf Studien, die mit neonatalen Kardiomyozyten durchgeführt wurden (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Hypertrophie-Signaltransduktionswege in neonatalen Rattenkardiomyozyten** (modifiziert nach OLSON, 2004).

Anhand von neonatalen Kardiomyozyten wurde in den vergangenen Jahren vor allem die Aktivierung und Bedeutung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) untersucht. GPCRs spielen eine bedeutende Rolle bei der Regulation und Anpassung wichtiger Herzfunktionen. In der Regel sind diese transmembrangängigen Rezeptoren an 3 Klassen von Guanosintriphosphat-bindenden Proteinen ( $G_s$ ,  $G_q/G_{11}$ ,  $G_i$ ) gebunden, welche die vom Rezeptor vermittelten Signale an Effektoren, wie Enzyme und Ionenkanäle, weiterleiten. Etliche neurohumorale Faktoren vermitteln über das  $G_{\alpha_q}$ -Protein eine hypertrophe Antwort (DORN & BROWN, 1999). In den neonatalen Rattenkardiomyozyten-Modellen konnten in den letzten Jahren Erkenntnisse bei der Aufklärung von Calcium-abhängigen Signaltransduktionswegen gewonnen werden. Diverse Studien belegen zudem, dass das „Calcium-Signaling“ eine wichtige Rolle in der Hypertrophie-Entwicklung in Kardiomyozyten spielen könnte (OLSON & MOLKENTIN, 1999). Ursprünglich wurde die

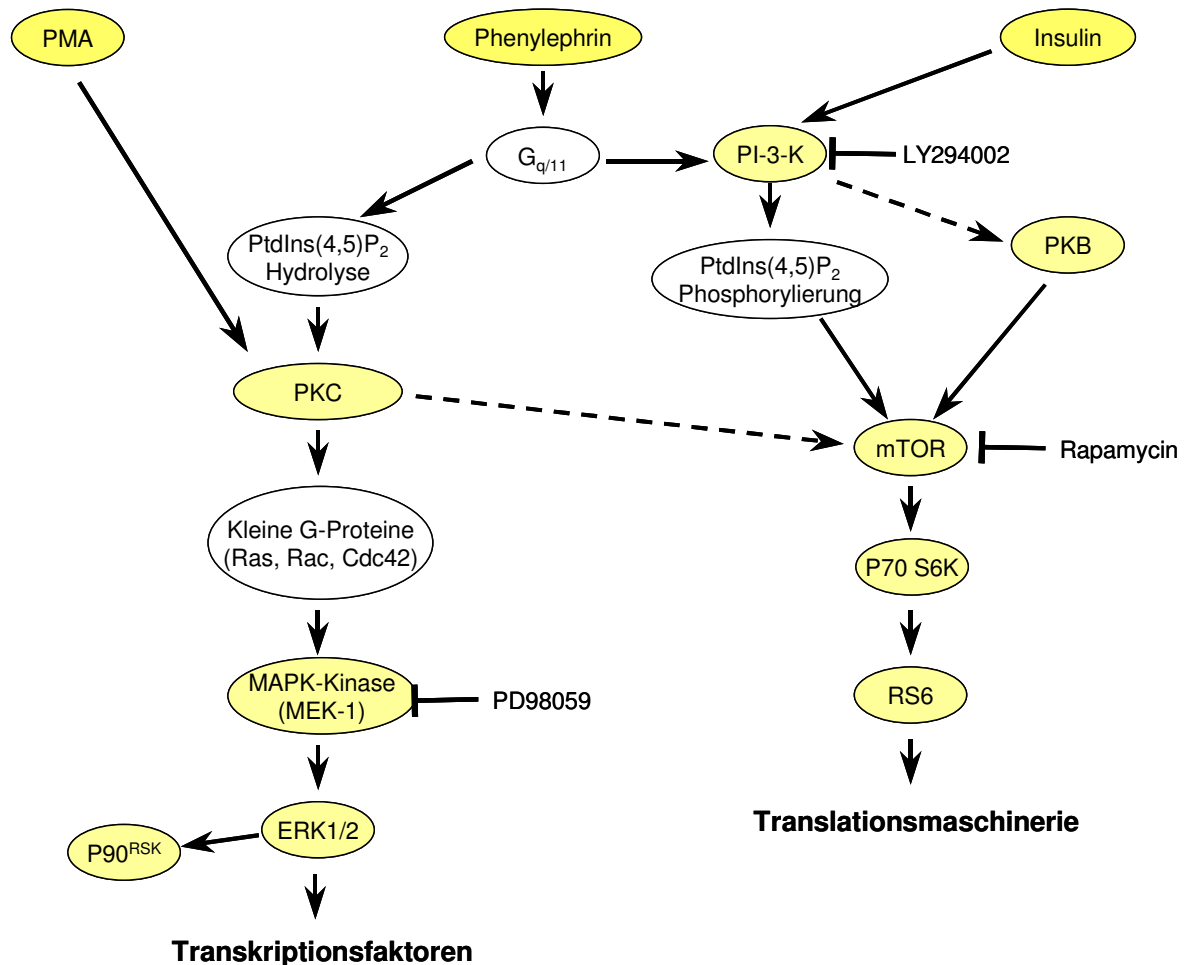
physiologische Rolle von Calcium-Ionen in T-Zellen aufgeklärt. In T-Zellen führt eine Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels zur Bindung an Calmodulin und zur Aktivierung des Enzyms. Die Serin/ Threonin-Phosphatase Calcineurin wird wiederum durch Calmodulin aktiviert (MOLKENTIN, 2000). Calcineurin dephosphoryliert ihrerseits Transkriptionsfaktoren des NFAT-Typs (*Nuclear Factor of Activated T-Cells*), wodurch es zu deren Translokation in den Zellkern und zur Aktivierung bestimmter fötaler Gene kommt (CRABTREE & OLSON, 2002). Neben dem Calcineurin-Signaltransduktionsweg spielt ferner auch die Aktivierung der ERK („*Extracellular signal regulated kinase*“)-Signalwege, einer Unterfamilie der MAPK („*mitogen acitvated protien kinase*“) (GLENNON ET AL., 1996), und die von Calcium-abhängigen Kinasen, wie z.B. die Protein Kinase C (PKC) aktivierten Signaltransduktionswege, eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung einer Hypertrophie in neonatalen Kardiomyozyten (LAZOU ET AL., 1994, NISHIZUKA ET AL., 1995).

In einer Arbeit von ZHANG ET AL. konnte gezeigt werden, dass einige der oben genannten Signaltransduktionswege im Zellkern zu einer Phosphorylierung einer bestimmten Subgruppe von Histondeacetylasen (Class II HDACs) führt, welche als Regulatoren des fötalen Genprogramms und kardialen Wachstums gelten (ZHANG ET AL., 2002). Diese Hypothese konnte anhand von „*Knockout*“ Mäusen, die äußerst sensibel auf hypertrophe Stimuli reagieren, bestätigt werden (ZHANG ET AL., 2002). Etliche Transkriptionsfaktoren, wie MEF2, GATA4 oder SRF, die beim Aufbau des embryonalen Herzens von Bedeutung sind und in neonatalen Kardiomyozyten aktiviert vorliegen, sind ebenfalls Endpunkte hypertropher Signaltransduktionswege und sorgen ihrerseits für die Reexpression des fetalen Genprogramms (OLSON, 2004).

Einige der oben genannten Signaltransduktionswege konnten in adulten Kardiomyozyten bestätigt werden. So könnte auch dem ERK-Signaltransduktionsweg bei der kardialen Hypertrophie adulter Rattenkardiomyozyten eine bedeutende Funktion zukommen (WANG & PROUD, 2002). Die genaue Rolle dieser Kinase wird allerdings nach wie vor kontrovers diskutiert (WANG ET AL., 2001; WANG & PROUD, 2002., SCHLÜTER ET AL., 1999; RUF ET AL., 2002).

Daneben wurden in adulten Kardiomyozyten noch weitere wichtige Signaltransduktionswege aufgedeckt, die in neonatalen Kardiomyozyten nicht explizit beschrieben sind (Abbildung 2).





**Abbildung 2: Schematische Darstellung möglicher Signaltransduktionswege, die zur Entwicklung eines hypertrophen Phänotyps in adulten Rattenkardiomyozyten beitragen können** (modifiziert nach SUGDEN & CLERK, 1998). PMA, Phenylephrin und Insulin stellen Induktoren verschiedener Signalkaskaden der Hypertrophie dar.

Untersuchungen zur adrenerg-vermittelten Hypertrophie-Induktion, die bei adulten Kardiomyozyten ebenfalls über eine Aktivierung der PKC verläuft (PUCEAT ET AL., 1994), legen eine Rolle der 70kDa ribosomalen S6 Kinase (p70 S6K) für die Vermittlung trophischer Effekte nahe (AVRUCH ET AL., 2001). Etliche Studien in Zelllinien mit Stimuli wie Insulin oder anderen Wachstumsfaktoren zeigen eine wichtige Rolle der Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase (PI-3-K)/ 3-Phosphoinositid-abhängigen Protein Kinase 1 (PDK1) und der Protein Kinase B (auch Akt genannt) für die Regulation der p70 S6K (ALESSI ET AL., 1998; PULLEN ET AL., 1998). Die PI-3-K, genauso wie die PKB können über das zwischengeschaltete sogenannte mTOR („*mammalian target of rapamycin*“) die Aktivierung der p70 S6K bewirken (BOGOYEVTCH & SUGDEN, 1996, WANG ET AL., 2000). Weitere Publikationen belegen, dass auch andere Signalmechanismen, z.B. das „Calcium-Signaling“, die ERK und die PKC wichtig für die Regulation der p70 S6K in adulten Kardiomyozyten sind (CONUS ET AL., 1998; RYBKIN ET AL., 2000; LASER ET AL., 1998; WANG & PROUD, 2002 (A); WANG & PROUD;

2003). Die p70 S6K kann wiederum das S6-Protein der kleinen Untereinheit eukaryontischer Ribosomen (40S-Untereinheit) phosphorylieren und dadurch die Initiation und Elongation der Translation beschleunigen (ERIKSON, 1991).

In adulten Rattenkardiomyozyten deuten die spezifischen Signaltransduktionswege der Hypertrophie eher auf eine bedeutende Rolle der Translation hin, anders als bei neonatalen, bei denen die Transkription wahrscheinlich von größerer Bedeutung ist (HANNAN ET AL., 2003).

#### **1.4 Die Rolle adrenerger Rezeptoren bei der Hypertrophie**

Anhand von Zellkulturmodellen neonataler und adulter Kardiomyozyten der Ratte konnte gezeigt werden, dass eine  $\alpha$ -adrenerge Stimulation zu einer Hypertrophie-Induktion führt (ZHENG ET AL., 1996; SCHLÜTER & PIPER, 1992). Diese wird ausschließlich über  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren vermittelt (SIMPSON, 1983).  $\alpha_2$ -Adrenozeptor-Subtypen sind in isolierten Kardiomyozyten nicht exprimiert (BUXTON & BRUNTON 1986). Nach einer  $\alpha_1$ -adrenergen Stimulation traten neben der Vergrößerung der Kardiomyozyten (MEIDELL ET AL., 1986) ein erhöhter zellulärer RNA- und Protein-Gehalt (ALLO ET AL., 1992) auf. Dabei sind keine Spezies-spezifischen Unterschiede in der  $\alpha_1$ -adrenergen Hypertrophieantwort adulter Kardiomyozyten festzustellen (CLARK ET AL., 1993, DECKER ET AL., 1993). Nach  $\alpha_1$ -adrenerger Stimulation (z.B. durch Phenylephrin) isolierter Kardiomyozyten konnte zudem die Induktion des Protoonkogens *c-myc* (IKEDA ET AL.; 1991; POLLACK ET AL., 1994), der  $\beta$ -Isoform der schweren Kette des Myosins (SCHLÜTER ET AL., 1998; HANNAN ET AL., 2003) und die Induktion des fötalen Kreatinkinase-BB-Isoenzymes beobachtet werden (SCHLÜTER ET AL., 2000).

In frisch isolierten adulten Kardiomyozyten konnte lange Zeit kein direkter Effekt der nicht-spezifischen  $\beta$ -Adrenozeptor-Stimulation gefunden werden. Ein Durchbruch gelang mit der Kombination eines nicht-selektiven  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Agonisten, wie Isoprenalin, unter gleichzeitiger Gabe eines selektiven  $\beta_2$ -Adrenozeptor Antagonisten (z.B. ICI-118551) (SCHÄFER ET AL., 2000). Die Ergebnisse dieser Studie demonstrierten zum ersten Mal, dass eine  $\beta$ -Adrenozeptor Stimulation in einer physiologisch vertretbaren Konzentration eine Hypertrophie in adulten Rattenkardiomyozyten induzieren kann. Vorausgesetzt ist hierbei, dass ausschließlich der  $\beta_1$ -Adrenozeptor stimuliert wird.

Natürliche Katecholamine, wie der physiologische Agonist Noradrenalin, können u.a. kardiale  $\alpha_1$ - und  $\beta_1$ -Adrenozeptoren gleichzeitig stimulieren. Frühere Untersuchungen zeigten, dass Noradrenalin selbst in hohen Konzentrationen die Proteinsynthese und Hypertrophie adulter Kardiomyozyten nur sehr moderat stimuliert (SCHLÜTER & PIPER, 1992). Die Überprüfung der anfallenden Hypothese, ob eine  $\alpha_1$ -adrenerge Hypertrophie-Induktion mittels Noradrenalin, aufgrund der gleichzeitigen Stimulation der  $\beta_1$ -Adrenozeptoren beeinflusst wird, zeigte, dass durch die Hemmung der  $\beta_1$ -Adrenozeptoren in adulten Rattenkardiomyozyten die  $\alpha_1$ -adrenerge Hypertrophie-induzierende Wirkung verstärkt wird (SCHÄFER ET AL., 2001). Dem  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor kommt also eine duale Rolle hinsichtlich der adrenerg bedingten Hypertrophie-Induktion zu: Einerseits kann durch ausschließliche  $\beta_1$ -adrenerge Stimulation eine Hypertrophie in adulten Kardiomyozyten ausgelöst werden, andererseits wirkt die  $\beta_1$ -adrenerge Stimulation als „Hypertrophie-Bremse“ einer  $\alpha_1$ -adrenerge Hypertrophie-Induktion. Vom klinischen Bild einer Herzinsuffizienz ist ferner bekannt, dass das  $\beta$ -Adrenozeptor-Adenylatzyklase-System, vermutlich aufgrund einer Desensibilisierung funktionell beeinträchtigt ist (LOHSE, 1992). Daraus lässt folgern, dass der Hypertrophie-auslösende Effekt unter adrenerger Stimulation der dann demaskierte  $\alpha_1$ -adrenerge Rezeptor ist. Somit stellt der  $\alpha_1$ -adrenerge Stimulus ein relevantes Modell zur Untersuchung der myokardialen Hypertrophie dar.

### **1.5 Natrium-Protonen-Austauscher**

In den letzten Jahren wurde der Regulation des intrazellulären pH-Werts in verschiedenen wichtigen Herz-Kreislauf-Indikationen eine tragende Rolle zu gesprochen (HORI ET AL., 1990; SCHLUTER ET AL., 1998(A). An dieser pH-Kontrolle ist ein Transporter, der Natrium-Protonen-Austauscher (NHE), in der Zellmembran wesentlich beteiligt (PUTNEY ET AL., 2002). Sardet und Pouyssegur gelang es 1989, die Struktur und die Expression des Austauschers eingehend zu untersuchen und zu klonieren (SARDET & POUYSSEGUR, 1989). Derzeit sind acht NHE-Isoformen identifiziert (NHE-1 bis NHE-8), die strukturell und funktionell betrachtet ähnlich sind, aber unterschiedliche Gewebeverteilung und z.T. unterschiedliche pharmakologische Eigenschaften aufweisen (BURCKHARDT ET AL., 2002). Der vorherrschende Subtyp im Kardiomyozyten ist die NHE-1-Isoform (KARMAZYN ET AL., 1999). Diese Isoform ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 110 kDa (KARMAZYN, 2001). Der NHE-1 ist vorwiegend in der Plasmamembran in Zell-Zell-Kontakt zwischen Kardiomyozyten lokalisiert (PETRECCA ET AL., 1999). Neben seiner Hauptaufgabe

in der pH-Regulation der Zelle spielt der Austauscher auch eine Rolle für den Natriumionen-Einstrom und wirkt aktiv an der osmotischen Regulation des Zellvolumens mit (ORLOWSKI AND GRINSTEIN, 1997; COUNILLON & POUYSSÉGUR, 2000). Hierzu werden Protonen im Austausch gegen Natriumionen im Verhältnis 1:1 ausgeschleust, womit der Prozess elektroneutral gehalten wird (ARONSON, 1985). Die Aktivierung des Austauschers erfolgt nicht nur pH-bedingt, sondern ist auch über parakrine und autokrine Faktoren, einschließlich phosphorylierungs-abhängiger Prozesse, reguliert (KARMAZYN ET AL., 2001). Während die Aktivität des Austauschers unter physiologischen pH-Bedingungen (7,1-7,3) eher unbedeutend ist, kommt es zu einer sehr schnellen Aktivierung bei fallendem pH-Wert (KARMAZYN ET AL., 2001). Seine maximale Aktivität erreicht der Austauscher bei einem intrazellulären pH von 6,5 (FLIEGEL, 2001).

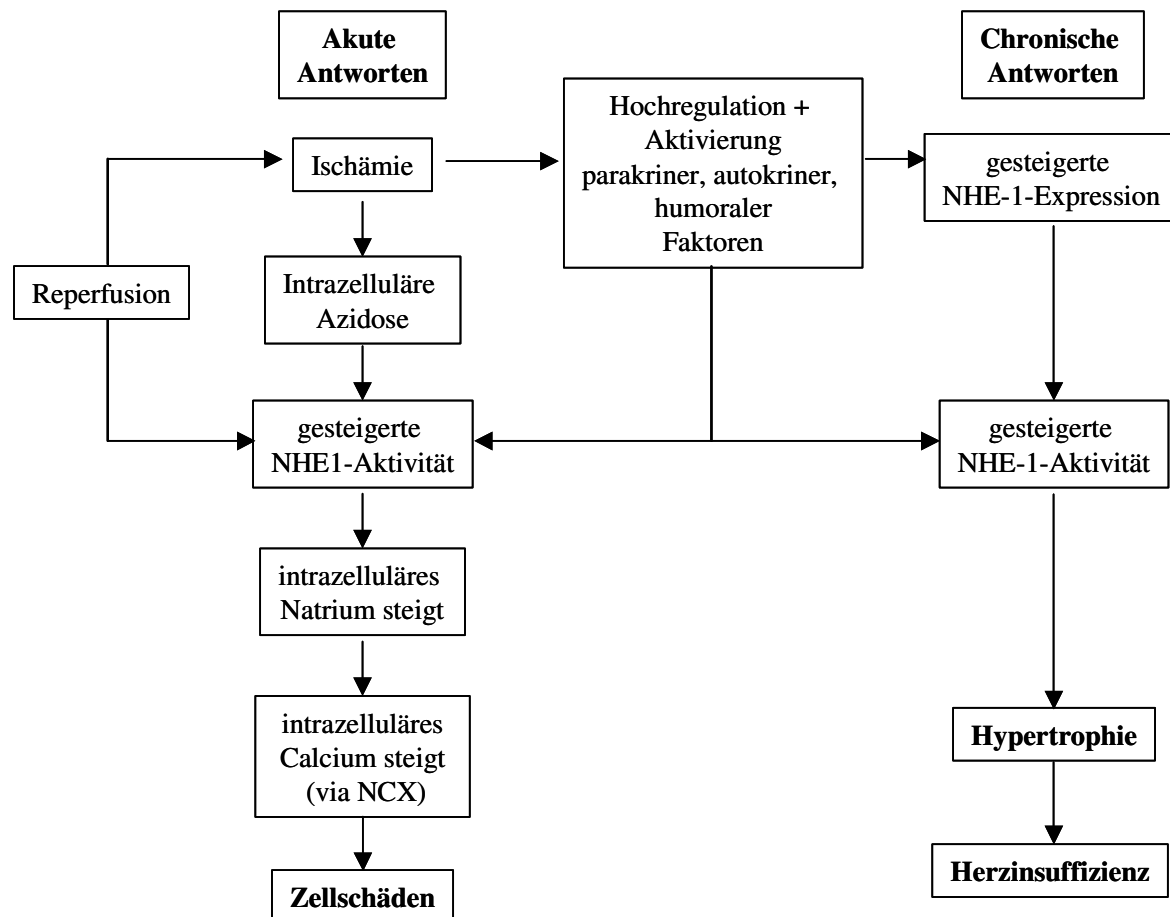
## **1.6 Natrium-Protonen-Austauscher-Inhibitoren**

Die zuerst entdeckten Hemmstoffe des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers gehören zur Familie der Amiloride. Diese sind seit 1971 als unspezifische, potente Hemmer des NHE im distalen Tubulus der Niere bekannt und werden als Kalium-sparende Diuretika eingesetzt (KLEYMAN ET AL., 1988). Da diese Inhibitoren jedoch nicht nur den NHE-1 hemmen, haben sie besonders bei höherer Dosierung unspezifische Nebenwirkungen (MENTZER ET AL., 2003). Dies hat zur Entwicklung neuer Benzoylguanidin-Verbindungen geführt, die speziell gegen NHE-1 gerichtet sind. Die erste derartige Verbindung war 3-Methylsulfonyl-4-piperidinobenzoylguanidin (HOE694) (COUNILLON ET AL., 1993), der 4-Isopropyl-3-methylsulphonylbenzoylguanidin methansulphonat (HOE642, Cariporide) folgte (SCHOLZ ET AL., 1995). Diese Verbindungen sind in therapeutischen Dosierungen ausschließlich gegen die NHE-1-Isoform gerichtet und haben sehr geringe bis keine Effekte auf andere Isoformen (SCHOLZ ET AL., 1999; MENTZER ET AL., 2003). Der Interaktionsmechanismus zwischen NHE-1-Inhibitoren und dem Austauscher ist nicht genau bekannt. Jedoch ist sicher, dass es zu einer Bindung des Inhibitors an lipophile transmembranäre Einheiten kommt (KARMAZYN ET AL., 2001).

Neben Cariporide befinden sich derzeit noch diverse andere NHE-1-Inhibitorverbindungen auch anderer forschender Pharmafirmen in der präklinischen und klinischen Forschung (LINZ & BUSCH, 2003).

### **1.7 Spezifische Rolle des NHE-1 im Myokard**

Dem NHE-1 kommt eine vielseitige Bedeutung im Myokard zu. Inzwischen konnten die oben erwähnten NHE-1-Inhibitoren in akuten oder chronischen Myokarderkrankungs-Modellen validiert werden (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Vereinfachte schematische Darstellung der potentiellen Rolle des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers während akuter und chronischer Postinfarkt-Situationen** (modifiziert nach KARMAZYN ET AL., 2001).

Während einer Ischämie kommt es sowohl intrazellulär als auch extrazellulär zu einem pH-Abfall. Die intrazelluläre Azidose ist eine Folge des anaeroben Metabolismus und des ATP Katabolismus während der Ischämie. Der niedrige intrazelluläre pH-Wert führt konsekutiv zu einer schnellen Aktivierung des NHE-1, welcher daraufhin  $\text{H}^+$ -Ionen aus der Zelle heraus- und dafür  $\text{Na}^+$ -Ionen in die Zelle hineinschleust (VAUGHAN-JONES ET AL., 1990). Dies führt zu einer Akkumulation von intrazellulärem Natrium. Zusätzlich nimmt auch die Fähigkeit der Zelle ab, Natrium herauszutransportieren, da zum einen die extrazelluläre Akkumulation von  $\text{H}^+$ -Ionen zu einer Hemmung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase führt (KARMAZYN ET AL., 2001), zum anderen es zu einer Verringerung des zytoplasmatischen ATP- und somit Energiegehalts

kommt (GOSS ET AL., 1994). Der erhöhte intrazelluläre Gehalt an  $\text{Na}^+$ -Ionen aktiviert den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers (NCX) mit der Konsequenz eines Anstieges der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (SIFPERT & AKKERMAN, 1989). Die sogenannte Calcium-Überladung ist die Ursache von Arrhythmien, Hyperkontraktilität, Zellnekrosen und Zelltod durch Apoptose.

Die Hemmung des NHE-1 hat - vor allem wenn Inhibitoren vor einer Ischämie verabreicht wurden - eine merkliche Reduktion der Calcium-Überladung zur Folge (PIKE ET AL., 1993; HENDRIX ET AL., 1994). Parallel kommt es zu einer Reduktion des ATP-Verbrauchs, des anaeroben Metabolismus sowie der Laktatbildung. Die Speicher von energiereichen Phosphaten und Glycogen bleiben erhalten (SCHOLZ ET AL., 1993; 1995). Verschiedene Studien konnten auch eine Reduktion der Infarktgröße zeigen. Arrhythmien, Hyperkontraktilität und Nekrosen mit einhergehendem Funktionsverlust des ischämischen Gewebes werden dadurch merklich verringert. Ein gewisser Schutz wird auch noch bei Anwesenheit des Inhibitors während Reperfusion gesehen, wo ein zusätzlicher  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung in der frühen Phase verhindert wird (SCHOLZ ET AL., 1999).

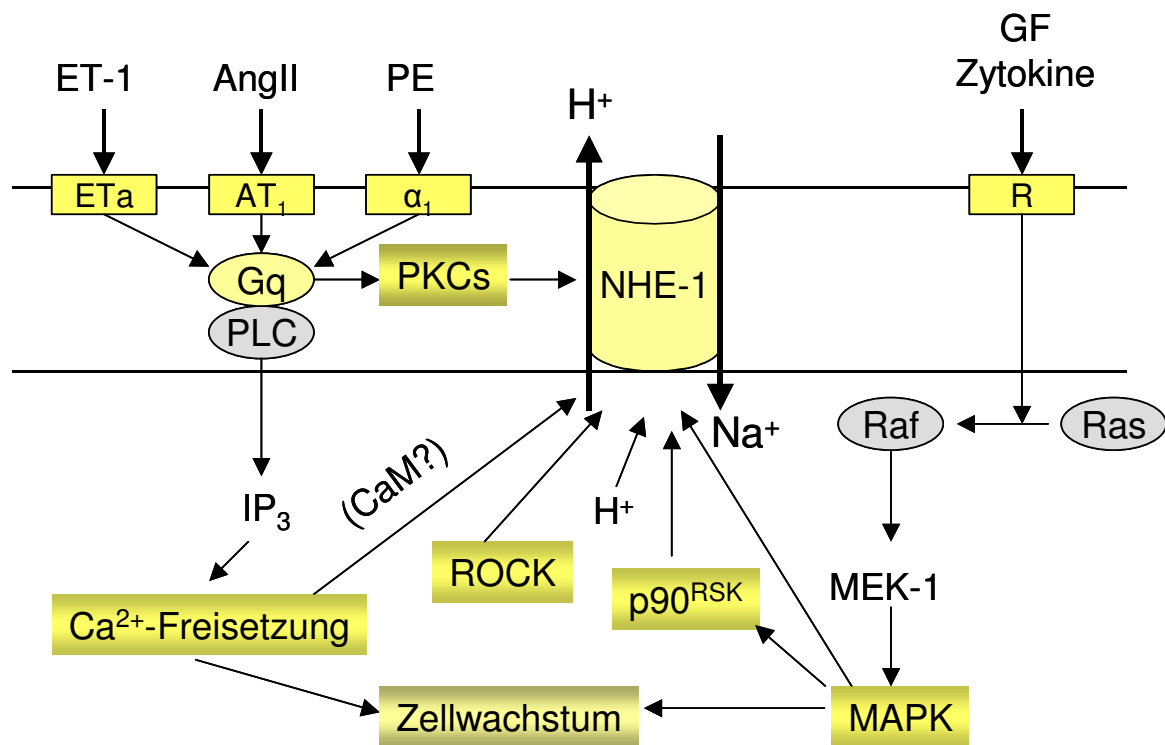
Zusätzlich zu der bereits genannten akuten Protektion während einer Ischämie kommen immer eindringlichere Hinweise auf, dass eine NHE-1-Inhibition auch positive Effekte im postinfarzierten Myokard in Bezug auf Hypertrophieentwicklung, den *Remodelling*-Prozess und eine konsekutive Herzinsuffizienz bietet (KARMAZYN ET AL., 2001).

Inzwischen konnte in verschiedenen Studien (YOSHIDA ET AL., 2000; CAMILION DE HURTADO ET AL., 2002; JANDELEIT-DAHME ET AL., 2000) gezeigt werden, dass der NHE-1 auch in der Entwicklung der kardialen Hypertrophie und des „*Remodelling*“ involviert ist und zum Prozess der Herzinsuffizienz beiträgt (KARMAZYN, 2001). Verschiedene sog. Hypertrophie-induzierende Faktoren, wie  $\alpha_1$ -adrenerge Agonisten (YOKOYAMA ET AL., 1998), Endothelin-1 (KHANDOUDI ET AL., 1994), Angiotensin II (GUNASEGARAM ET AL., 1999) und Thrombin (GLEMBOTSKI ET AL., 1993), werden kausal durch erhöhte Arbeitslast und Dehnungsreize des insuffizienten Herzens aktiviert (MATSUI ET AL., 1995). Sie steigern im Folgenden die Affinität des NHE-1-Austauschers gegenüber  $\text{H}^+$ -Ionen und somit dessen Aktivität (CINGOLANI ET AL., 1998) durch vermehrte Phosphorylierung des Proteins. Dies führt zu der Annahme, dass NHE-1 der nachgeschaltete Mediator für zumindest einige der genannten Faktoren ist und zur zellulären Hypertrophie beiträgt. Der hier ebenfalls erhöhte intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Ionen-Gehalt aktiviert auch den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX), wodurch gleichfalls ein intrazellulärer Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration folgt. Dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg wird grundsätzlich als Signal für Zellwachstum erkannt (MARBAN & KORETSUNE, 1990). Ferner werden

intrazellulär erhöhten  $\text{Na}^+$ -Ionenkonzentration *per se* ein verstärkender Effekt auf die Proteinsynthese, sowie ein reduzierender Effekt auf den Proteinabbau zugeschrieben, was zusätzlich den Hypertrophieprozess begünstigen kann (GU ET AL., 1998). Schließlich beschleunigt auch eine Erhöhung des intrazellulären pH-Wertes ins Alkalische um 0,1 Einheiten die Proteinsynthese um 40% (FULLER ET AL., 1990). Die Ergebnisse dieser genannten und anderer Studien deuten daraufhin, dass die linksventrikuläre Hypertrophie nach einem Herzinfarkt zumindest teilweise durch die erhöhte Aktivität des NHE-1 bedingt ist. Dies wird unterstützt durch Studien in verschiedenen Tierspezies, die eine eindeutige Reduktion der kardialen Hypertrophie nach NHE-1-Inhibition zeigen (SCHLÜTER ET AL., 1998(A), ENGELHARDT ET AL., 2002).

Eine Involvierung des NHE-1 bei der  $\alpha_1$ -adrenerg vermittelten Hypertrophie wird schon länger angenommen. Die ersten Hinweise, dass  $\alpha$ -adrenerge Rezeptoren die sarcolemmale NHE-1-Aktivität stimulieren, wurden durch Experimente mit isolierten Kardiomyozyten erhalten, in denen die hypertrophe Antwort von Noradrenalin mittels dem  $\alpha$ -adrenergen Rezeptorblockers Prazosin oder dem unspezifischen NHE-1-Inhibitor Hexamethylamilorid gehemmt werden konnte (IWAKURA ET AL., 1990). Ähnliche Daten wurden schnell auch für  $\alpha$ -spezifische Agonisten, wie z.B. Phenylephrin (HORI ET AL., 1990; TERZIC ET AL., 1992) und spezifische NHE-1-Inhibitoren, wie z.B. HOE694 (SCHLÜTER ET AL., 1998(A)), erhoben.

In Kardiomyozyten ist die Regulation der sarcolemmalen NHE-1-Aktivität einer Vielzahl von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) zuzuschreiben. Etliche der dazugehörigen Signaltransduktionswege, die zu einer NHE-1-Aktivierung führen können, sind in der Literatur bereits beschrieben (Abbildung 4).



**Abbildung 4. Vereinfachte Darstellung möglicher Signaltransduktionswege, die zu einer NHE-Aktivierung und resultierendem Zellwachstum führen könnten** (modifiziert nach KARMAZYN ET AL., 1999). Verwendete Abkürzungen: NHE „Natrium-Protonen-Austauscher“, MAPK „mitogen activated protein kinases“, PLC „Phospholipase C“, GF „Wachstumsfaktoren“, IP<sub>3</sub> „Inositol-3-Phosphat“, PKC „Protein Kinase C“, CaM „Calmodulin“, Rock „Rho associated Kinase“.

Ein Anstieg in der NHE-1-Aktivität manifestiert sich in aller Regel als hypertrophe Antwort auf Stimulation des α<sub>1</sub>-adrenergen- (WALLERT & FROHLICH, 1992; YOKOYAME ET AL., 1998), Angiotensin AT<sub>1</sub>- (MATSUI ET AL., 1995; GUNASEGARAM ET AL., 1999), oder Endothelin-Rezeptors (KHANDOUDI ET AL., 1994; WOO ET AL., 1999) oder durch Wachstumsfaktoren (WAKABAYASHI ET AL., 1992; BIANCHINI ET AL., 1996).

Die Stimulation der Rezeptoren steigert im Folgenden, die Affinität des NHE-1-Austauschers gegenüber H<sup>+</sup>-Ionen und somit dessen Aktivität.

Die vermehrte Phosphorylierung des Proteins kann ebenso z.B. über so genannte „mitogen activated protein kinases“ (MAPKs) erfolgen (TAKEWAKI ET AL., 1995). Konsekutiv kommt es durch die gesteigerte Aktivität des NHE-1 zu einem intrazellulären Anstieg von Na<sup>+</sup>-Ionen, gefolgt von dem bereits oben beschriebenen Effekt des Ca<sup>2+</sup>-Anstiegs. Durch erhöhte Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen können ebenso MAPKs aktiviert werden (EGUCHI ET AL., 1996), die dann wiederum die Aktivität des NHE-1 weiterhin steigern.

Als weitere Antwort auf eine GPCR-Aktivierung kann es durch die Stimulation der Phospholipase C (PLC) zur Aktivierung der PKC kommen, die ihrerseits den NHE-1 aktiviert (AVKIRAN & HAWORTH, 2003). In diesem Zusammenhang führt auch die Stimulation der MAPK durch Wachstumsfaktoren (GF) oder Zytokine zu einer Stimulierung des NHE-1,



genauso wie ischämische Metabolite einschließlich  $H^+$ -Ionen. Etliche begleitende Prozesse, einschließlich der Inositol-3-Phosphat ( $IP_3$ )-induzierten Freisetzung von  $Ca^{2+}$ -Ionen, als auch die zelluläre Alkanisierung über den NHE-1 selbst, können die Proteinsynthese und die Zellvolumenzunahme beeinflussen (KARMAZYN ET AL., 1999). Neben den in der Abbildung 4 aufgeführten Kinasen wie PKC oder MAPK, werden auch die Rho-associated kinase p160 (ROCK) (TOMINAGA ET AL., 1998) und die p90 ribosomale S6 Kinase ( $p90^{RSK}$ ) als potentieller NHE-1-Aktivatoren in der Literatur diskutiert (TAKAHASHI ET AL., 1999; für einen Überblick siehe AVKIRAN & HAWORTH, 2003).

Den hier aufgeführten Studien ist gemein, dass sie zeigen, wie der NHE-1 in Kardiomyozyten durch verschiedene „*second messenger*“ und bestimmte Signaltransduktionswege aktiviert werden kann. Nachgeschalteten Signale oder Signaltransduktionsmechanismen, die nach einer Aktivierung des NHE-1 unter Hypertrophie-Bedingungen aktiviert werden, sind dagegen weitgehendst noch nicht erforscht.

## **1.8 Aufgabenstellung**

Wie beschrieben, spielt der NHE-1 eine bedeutende Rolle in der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie. Die Herzhypertrophie gilt als ein starker Prädiktor für das Erkranken an einer Herzinsuffizienz. Die Lebenserwartung der Patienten mit symptomatischer Herzinsuffizienz ist trotz der bestehenden Therapie mit ACE-Hemmern,  $\beta$ -Blockern und Diuretika erheblich eingeschränkt. Daher ist es von großer Bedeutung, die zur Herzinsuffizienz beitragende Hypertrophie möglichst früh zu beeinflussen. Isolierte Herzmuskelzellen bieten sich als zelluläres *in vitro* Modell zur Hypertrophie-Messung an.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es,

- die Isolierung und Kultivierung von Kardiomyozyten aus adulten Rattenherzen zu etablieren und in Richtung eines Hypertrophie-Modells zu optimieren.
- anhand dieses Hypertrophie-Modells die NHE-1-vermittelten Signaltransduktionsmechanismen näher zu charakterisieren. Zur Validierung der Signaltransduktionswege konnten spezifische NHE-1-Inhibitoren, wie z.B. Cariporide (HOE642), verwendet werden.
- Ein weiterer Teil der vorliegenden Arbeit war das Aufklären von Genexpressionsunterschieden zwischen hypertrophen und Cariporide-behandelten Myokardzellen mittels der DNA-Microchip-Technologie. Die gefundenen Gene sollten anschließend durch weitere Experimente, wie z.B. durch Echt-Zeit-PCR und Western Blot in den verschiedenen *in vitro* Modellen charakterisiert werden.

## **2 Material und Methoden**

In diesem Kapitel werden die angewandten molekularbiologischen, zellbiologischen und biochemischen Methoden erläutert sowie die hierbei eingesetzten Materialien tabellarisch aufgelistet.

### **2.1 Chemikalien & Enzyme**

#### **Acros Organics, Belgium**

N-Methyl-D-glucamine (99%)	Kat.-Nr. 12684-0050
----------------------------	---------------------

#### **Ambion Inc., USA**

DNA-free <sup>™</sup> -Dnase Treatment & removal	Kat.-Nr. 1906
--	---------------

#### **Amersham Pharmacia Biotech, UK**

L-[U- <sup>14</sup> C]-Phenylalanin	Kat.-Nr. CFB70-50μCi
[U- <sup>14</sup> C]-Uridin	Kat.-Nr. CFB51-50μCi

#### **Biochrom, Berlin**

MEM-Joklik (w L-Glutamine, w/o NaHCO <sub>3</sub> )	Kat.-Nr. T441-10
---	------------------

#### **BD Biosciences, USA**

Laminin – ultrapure, mouse	Kat.-Nr. 354239
----------------------------	-----------------

#### **Bio-Rad, USA**

D <sub>c</sub> Protein Assay Reagent A	Kat.-Nr. 500-0113
D <sub>c</sub> Protein Assay Reagent B	Kat.-Nr. 500-0114
D <sub>c</sub> Protein Assay Reagent S	Kat.-Nr. 500-0115
FITC	Kat.-Nr. 170-8780
100bp PCR Molecular Ruler	Kat.-Nr. 170-8206
Criterion <sup>™</sup> Precast Gel 4-15% Tris-HCl	Kat.-Nr. 345-0029
Premixed 10x Tris Glycin Buffer	Kat.-Nr. 161-0734
10x Tris/Glycine/SDS Buffer	Kat.-Nr. 161-0732

#### **Cell Signaling Technology, USA, polyklonale Antikörper aus Kaninchen**

Phospho-p90RSK (Ser380)	Kat.-Nr. 9341
Phospho-p70 S6 Kinase (Thr421/Ser424)	Kat.-Nr. 9204

#### **Chemicon International, USA, monoklonaler Antikörper aus Maus**

Mouse Anti-Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> Exchanger-1 [NHE-1] IgG <sub>1</sub>	Kat.-Nr. MAB3140
---	------------------

#### **GibcoBRL, USA**

Agarose ultra pure	Kat.-Nr. 15510-027
Ethylendiamintetraessigsäure (0,5M EDTA)	Kat.-Nr. 15575-038
Trizol-Reagenz	Kat.-Nr. 15596-018

**Fluka Chemie GmbH, Deutschland**

2,3-Butanedioneoxime-diacetylmonoxim	Kat.-Nr. 31550
--------------------------------------	----------------

**Invitrogen, USA, Reagenzien und Gele für SDS-Proteingelelektrophorese**

NuPAGE Transfer Buffer	Kat.-Nr. NP0006-1
NupAGE <sup>®</sup> MOPS SDS Running Buffer (20x)	Kat.-Nr. NP0001
Novex Tris-Acetate SDS Running Buffer	Kat.-Nr. LA0050
Novex 4-12% Bis-Tris 1mm Gel	Kat.-Nr. NP0329BOX
Novex 7% Tris-Acetate 1mm Gel	Kat.-Nr. EA03552
Novex 10% Bis-Tris Gel	Kat.-Nr. NP0321BOX
Olido(dT) <sub>12-18</sub> Primer	Kat.-Nr. 1.8418-012
TOPO TA Cloning Kit	Kat.-Nr. K-4650-01
PKC $\alpha$ , $\beta$ , $\delta$ , $\epsilon$ -Positivkontrolle	Kat.-Nr. P2232,-54,-33,-92

**LI-COR, USA**

Odyssey <sup>®</sup> Blocking buffer	Kat.-Nr. 927-40000
Odyssey <sup>®</sup> Molecular Weight Markers	Kat.-Nr. 928-40000

**Merck, Darmstadt**

Chloroform	Kat.-Nr. 102444
Ethanol absolut	Kat.-Nr. 100983
Methanol absolut	Kat.-Nr. 106018
Triton-X-100 absolut	Kat.-Nr. 108603

**Molecular Probes, USA**

Alexa Fluor <sup>®</sup> 680 goat anti-rabbit IgG	Kat.-Nr. A-21076
Alexa Fluor <sup>®</sup> 680 goat anti-mouse IgG	Kat.-Nr. A-21057
Alexa Fluor <sup>®</sup> 680 donkey anti-goat IgG	Kat.-Nr. A-210
Fura-2	Kat.-Nr. F1221
PicoGreen <sup>®</sup> dsDNA quantitation Kit	Kat.-Nr. P7589

**PAA Laboratories, Österreich**

Penicillin/ Streptomycin (100x)	Kat.-Nr. P11-010
---------------------------------	------------------

**Packard Bioscience, USA**

Ultima Gold <sup>™</sup> MV	Kat.-Nr. 6013159
-----------------------------	------------------

**PAN Bioscience, Aidenbach**

Albumin Fraction V	Kat.-Nr. P06-1391010
--------------------	----------------------

**Promega, Niederlande**

Random Primers (pDN6))	Kat.-Nr. C1181
rRNasin <sup>®</sup> Rnase Inhibitor	Kat.-Nr. N2511
TAQ DNA Polymerase	Kat.-Nr. M2605

**Qiagen, Hilden**

HotStarTaq™ DNA Polymerase	Kat.-Nr. 203203
Omniscript™ RT Kit	Kat.-Nr. 205113
Quantitect™ SYBR® Green PCR Kit	Kat.-Nr. 204143
Qiaprep™ -Spin-Miniprep-Kit (250)	Kat.-Nr. 27106
Qiaquick™ -Gel-Extraction-Kit (250)	Kat.-Nr. 28706

**Roche Diagnostics, Mannheim**

HEPES	Kat.-Nr. 737151
Liberase Blendenzym 4	Kat.-Nr. 1988468
Complete-Mini Protease Inhibitor Cocktail	Kat.-Nr. 1836153

**Santa Cruz Biotechnologies, USA, polyklonale Antikörper aus Ziege und Kaninchen**

Actin (C-11) IgG (Ziege)	Kat.-Nr. sc-1615
ERK 2 (C-14) IgG (Kaninchen)	Kat.-Nr. sc-154
cPKC $\alpha$ (C-20) IgG (Kaninchen)	Kat.-Nr. sc-208
PKC $\beta$ II (C-18) IgG (Kaninchen)	Kat.-Nr. sc-210
PKC $\delta$ (C-17) IgG (Kaninchen)	Kat.-Nr. sc-213
nPKC $\epsilon$ (C-15) IgG (Kaninchen)	Kat.-Nr. sc-214
NHE-1 (C-20) IgG (Ziege)	Kat.-Nr. sc-16097
EGR-1 (C-19) IgG (Kaninchen)	Kat.-Nr. Sc189

**Stratagene, USA**

Absolutely RNA™ Microprep Kit	Kat.-Nr. 400805
-------------------------------	-----------------

**TOCRIS, USA**

ICI118155	Kat.-Nr. 0821
LY294002	Kat.-Nr. 1130
PD98059	Kat.-Nr. 1213
Rapamycin	Kat.-Nr. 1292

**SPEZIFISCHE LIEFERANTEN**

Harlan Sprague- Dawley, USA	Sprague-Dawley-Ratten
SIGMA-Aldrich, Deisenhofen	Kundenorientierte Synthese spezifischer Oligonukleotide / PCR-Primer
AVENTIS (Medizinische Chemie)	NHE-1-Inhibitoren S4890, S6994, S4306 und Cariporide (HOE642)
AVENTIS (Medizinische Chemie)	NHE-1-Inhibitor der Firma Sanofi S9797
AVENTIS (Medizinische Chemie)	Spezifischer NHE-3-Inhibitor S4018A
AVENTIS (Medizinische Chemie)	NCX-Inhibitor SEA0400

Alle übrigen Chemikalien und Reagenzien wurden in höchster Reinheit und erhältlichen Qualität von SIGMA Aldrich (Deisenhofen) bezogen. Alle verwendeten Chemikalien wurden gemäß Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt.

## **2.2 Laborgeräte & Verbrauchsmaterial**

### **Zellkultur**

Präparationsbesteck	Aesculap, Heidelberg
Langendorff-Apparatur	Hugo Sachs Elektronik, Hugstetten
Mikroskop	Zeiss, Jena
Nylonnetz (0,2µM)	BD, Heidelberg
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Sterilfiltersysteme	BD, Heidelberg
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Anlage zur Herstellung von bidest. Wasser	Millipore, Eschborn
Flüssig-Szintillationszähler Tri-Carb 2900TR	Packard, Frankfurt a. M.
Vortexer MS1	IKA® Works Inc, USA
Szintillationsgefäße Pony Vials 6ml	Packard, Frankfurt a.M.
Einmalskalpelle (Cutfix)	Döll Medizintechnik, Hofheim
Kulturschalen	Typ: Falcon 3001, 3004, BD, Heidelberg
Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments, Hanau
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Thermomixer 5436	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Mikrotiterplatten, 96-well	Typ Costar, BD, Heidelberg
Saugkolben-Meßpipette (Fortuna®)	neoLab, Heidelberg
Photometer	Molecular Devices, USA
Video-Dokumentation	Intas, Göttingen
Einweg-Zellschaber	Typ Falcon 3087, BD, Heidelberg
Polarstar-96 well Fluorimeter	BMG Lab Technologies, Offenburg
Ultraschallgerät (Sonoplus)	Bandelin electronic, Berlin

### **Fluoreszenzmessung**

AR-Cation Measurement System	Spex Industries, Grasbrunn
Inverses Mikroskop	Diaphot TMD, Nikon, Japan
Photomultiplier	Spex Industries, Grassbrunn
Monitor	Belinea, Deutschland
Videokamera	Sony, Deutschland
Videoprinter	Hewlett Packard, USA
Perfusionskammer	Eigenbau
Gasdichte Schläuche	Kalensee, Gießen
Edelstahlkapillaren	Kalensee, Gießen

### **SDS-PAGE/ Western Blot**

Spezielles Blotpapier	BioRAD, USA
Nitrocellulosemembran	PALL, USA
Elektrophorese-Netzgerät	BioRad, USA
Vertikale Elektrophoresekammer	Novex, USA, BioRad, USA
Elektroblotkammer	Novex, USA, BioRad, USA

### **PCR-Geräte**

Agal Midi Wide	Biometra, Göttingen
iCycler	BioRad, USA
ICycler PCR Platten, 96 well	BioRad, USA
Abdeckfolie	Greiner bio-one, USA

Thermocycler Küvetten Uvetten (220-1600nm)	Biometra, Göttingen Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
---	---

### Auswertungs-Software

Image Quant QuantaSmart™	Molecular Dynamics, Krefeld Packard, USA
iCycler-Software	BioRad, USA
Analysen-Software Fluoreszenzmessung Resolver	Spex Industries, Grassbrunn Rosetta Biosoftware, USA
FLUOstar32, Version 4.01.0	BMG Lab Technologies, Offenburg

## 2.3 Medien, Puffer, Lösungen

### Joklik-Medium

11,36g MEM-Joklik, 3,6g HEPES, ad 1l Millipore -Wasser  
mit 1N NaOH auf pH 7,4 einstellen, anschließend steril filtrieren

### Enzym-Lösung

1 % BSA (frisch), 20µM CaCl<sub>2</sub>, 8,75Units Blendenzym 4, 100Units/0,1mg/ml Penicillin/  
Streptomycin, 500ml Joklik-Medium

### Waschlösung

500µM EDTA, 100Units/0,1mg/ml Penicillin/ Streptomycin, 500ml Joklik-Medium

### Powell-Medium: Endkonzentrationen in mM

110 NaCl, 2,6 KCl, 1,2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 MgSO<sub>4</sub>, 15 HEPES, 11 Glucose, 15 BDM, 0,1  
Ascorbinsäure

mit 1N NaOH auf pH 7,4 einstellen, anschließend steril filtrieren

### Na<sup>+</sup>-freies Powell-Medium: Endkonzentrationen in mM

145 N-Methyl-D-glucamine, 2,6 KCl, 1,2 H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 MgSO<sub>4</sub>, 15 HEPES, 11 Glucose, 15  
BDM, 1 CaCl<sub>2</sub>, 0,1 Ascorbinsäure

mit 1N KOH auf pH 7,4 einstellen, anschließend steril filtrieren

### CCT-Joklik-Medium: Endkonzentrationen in mM

2 L-Carnitin, 5 Taurin, 5 Creatin, 1 CaCl<sub>2</sub>, 0,01 Cytosin-arabino-furanosid, 0,1 Ascorbinsäure,  
ad 1l Joklik-Medium

mit 1N NaOH auf pH 7,4 einstellen, anschließend steril filtrieren

### Lysispuffer (SDS-PAGE)

10 mM Tris, 1% (wt/v) SDS, 1mM Natrium-ortho-vanadat

mit 1N NaOH auf pH 7,4 einstellen und je 10ml 1 Complete-Mini-Tablette frisch zugeben

### 5x SDS-Probenpuffer (Laemmli)

2,5 M Tris, 8% SDS, 20% Glycerin, 5% 2-Mercaptoethanol, 0,05% Bromphenolblau,

### Hypotoner Puffer (Membranpräparation)

10mM HEPES, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 2mM DTT

mit 1N NaOH auf pH 7,6 einstellen

**Lysispuffer (Membranpräparation)**

10mM HEPES, 150mM NaCl, 2mM DTT, 1% Triton-X 100, 1 Tablette Complete Mini mit 1N NaOH auf pH 7,6 einstellen
---

**6x Gel-Ladepuffer**

7 vol. Millipore-Wasser, 3 vol. Glycerin, 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 50mM EDTA
---

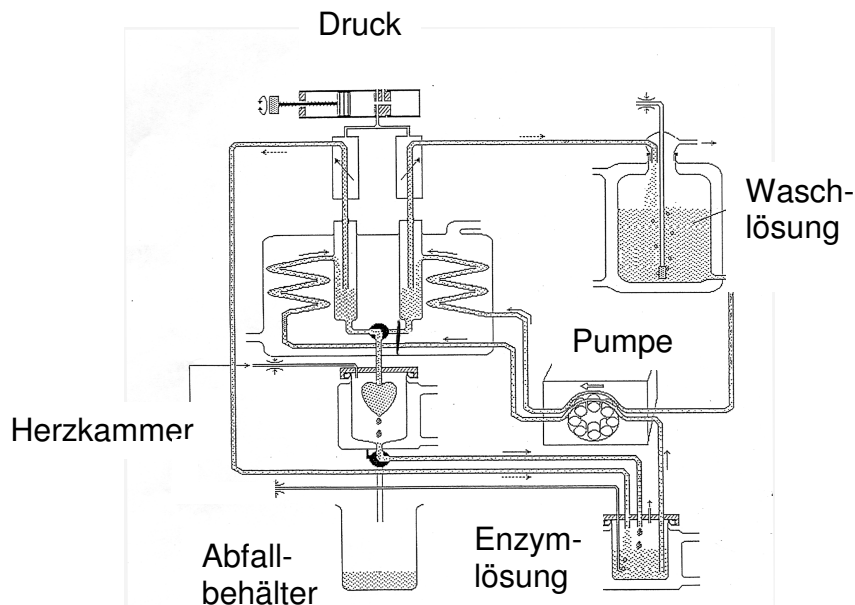
**50x TAE-Puffer**

242,2g TRIS, 14,61g EDTA, 57,1ml Eisessig, ad 1l Millipore-Wasser mit 1N NaOH auf pH 8,0 einstellen
--



## **2.4 Isolierung von adulten Kardiomyozyten der Ratte**

Zur Isolierung der Herzmuskelzellen fand eine modifizierte Langendorff-Perfusionsapparatur Anwendung, die bereits 1982 in ähnlichem Aufbau von PIPER ET AL. beschrieben wurde (Abbildung 5). Sie gewährleistete während der Gewebepfusion eine konstante Temperatur von 37°C, bot durch einen verschließbaren Auffangbecher eine Art „Klimakammer“ für das Herz und ermöglichte einen konstanten Perfusionsdruck.



**Abbildung 5: Perfusionsapparatur (modifiziert nach POWELL ET AL. 1980 und PIPER ET AL., 1992).** Der Druckgeber ermöglicht einen konstanten Perfusionsdruck für das Herz. Unter Zwischenschaltung eines Dreiwegehahns werden die Koronarien zunächst mit Wasch-, dann mit Enzymlösung perfundiert. Die Pumpe befördert die Enzymlösung zurück in das Reservoir, in dem es angewärmt wird und damit zur Reperfusion wieder zur Verfügung steht.

Die Herzmuskelzellen wurden aus adulten männlichen Sprague-Dawley Ratten (Lebendgewicht ca. 150-250g, Durchschnittsalter ca. 3-5 Monate) isoliert. Die Tiere stammten von der Firma Harlan Winkelmann (USA) und hatten jederzeit freien Zugang zu Nahrung und Wasser. Die Ratten wurden per Genickbruch getötet und der Brustraum geöffnet. Nach der Entfernung des Perikards wurde das Herz angehoben, vom Körper getrennt und sofort in eiskalten PBS gelegt. Darin wurde das Herz von Geweberesten befreit und anschließend mit der *Aorta ascendens* auf eine Kanüle gezogen und mit einer Klemme (Döll, Hofheim) fixiert. Die Kanüle wurde in die Langendorff-Apparatur eingebaut, in der sich das Herz reversibel perfundieren ließ. Zunächst wurde das im Herzen verbliebene Blut mit 50ml Wasch-Puffer (Joklik-Medium, 500µM EDTA) so lange ausgewaschen, bis das Eluat klar aus dem Herzen tropfte. Das Herz wurde anschließend mit 50ml Enzym-Lösung

(Joklik-Medium, 20µM CaCl<sub>2</sub> und 8,75 Einheiten Liberase Blendenzyme-4) für 30min rezirkulierend bei einer Flussrate von 2-3ml/min und einem Perfusionsdruck von 80mmHg perfundiert.

Nach Beendigung der Enzymperfusion ließen sich die Vorhöfe entfernen und das Herz in 45ml Powell-Lösung (zusammengesetzt aus: 110 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> mM, 1,2 MgSO<sub>4</sub> mM, 15 mM HEPES, 11 mM Glucose, 15 mM BDM, 0,1 mM Ascorbinsäure), welche zusätzlich mit 40µM CaCl<sub>2</sub> versetzt war, aufnehmen. In diesem Puffer wurden die Ventrikel mechanisch mit 2 Skalpellen zerkleinert. Anschließend wurde die Zellsuspension durch ein Nylonnetz mit 0,2mm Porengröße filtriert, um verbliebene Zellaggregate zu entfernen, und bei 27xg (Heraeus Megafuge 1.0R) sowie Raumtemperatur für vier Minuten zentrifugiert. Die frisch isolierten Kardiomyozyten wurden zuerst in Powell-Medium, das zusätzlich 200µM CaCl<sub>2</sub> und 15mM BDM enthielt, aufgenommen und erneut bei 27xg drei Minuten lang zentrifugiert. Dann wurde mit Powell-Medium resuspendiert, welches mit 400µM CaCl<sub>2</sub> und 10mM BDM versetzt worden war und wieder drei Minuten bei 27xg zentrifugiert. Die Resuspension des Zellpellets zu einer homogenen Zellsuspension erfolgte in CCT-Joklik-Medium (zusammengesetzt aus: 2 mM L-Carnitin, 5 mM Taurin, 5 mM Creatin, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,01 mM Cytosinarabinofuranosid, 0,1 mM Ascorbinsäure) durch sanftes Aufschütteln. Die Zellpopulation bestand zu 70 – 80% aus stäbchenförmigen ventrikulären Kardiomyozyten, sowie einigen Zelltrümmern und bereits abgestorbenen Kardiomyozyten. In der Regel wurden zwei Rattenherzen parallel an 2 Langendorf-Apparaturen perfundiert und die jeweiligen Pellets miteinander vereinigt.

## **2.5 Zellkultivierung**

In der vorliegenden Arbeit wurden die frisch isolierten Kardiomyozyten, wenn nicht anders vermerkt, direkt nach zweistündiger Anheftungsphase für die entsprechenden Experimente benutzt, wobei die stäbchenförmige Gestalt („rod shape“) der Zellen über den gesamten Zeitraum des Versuchs erhalten blieb.

Um eine Anheftung der isolierten Kardiomyozyten auf Kulturschalen der Größe 35x10mm (Typ Falcon 3001), sowie 60x15mm (Typ Falcon 3004) oder darin eingelegte Glasplättchen zu ermöglichen, wurden diese zuvor über Nacht bei 37°C mit 25ng/ml Laminin (BD) in Joklik-Medium vorbeschichtet. Mengenangaben beziehen sich in der Regel auf die Kulturschalen Typ Falcon 3001. Kulturschalen vom Typ 3004 wurden ausschließlich für die RNA-Isolierung angewendet.

Kurz vor dem Ausplattieren wurde das Vorbeschichtungsmedium durch 1ml frisches CCT-Joklikmedium in den Kulturschalen ersetzt.

Das Zellpellet der isolierten Kardiomyozyten wurde in CCT-Joklik-Medium (vgl. 3.1.2) zu einer homogenen Suspension aufgenommen und mit einer Dichte von  $2 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  ausplattiert. Zum Anheften der intakten Zellen wurden diese für zwei Stunden bei  $37^\circ\text{C}$ , unter  $\text{CO}_2$ -freien Bedingungen inkubiert und anschließend mit CCT-Joklik-Medium gewaschen, um verbliebene Zelltrümmer und abgerundete, bzw. bis dahin nicht angeheftete Zellen zu entfernen. Die frisch isolierten, angehefteten Zellen wurden mit 1,5ml CCT-Joklikmedium versetzt und dem jeweiligen Stimulus (z.B. Phenylephrin, PMA oder Insulin) in der angegebenen Konzentration ausgesetzt. Die Inkubation fand, soweit nicht anders erwähnt, im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$  unter Raumatmosphäre statt.

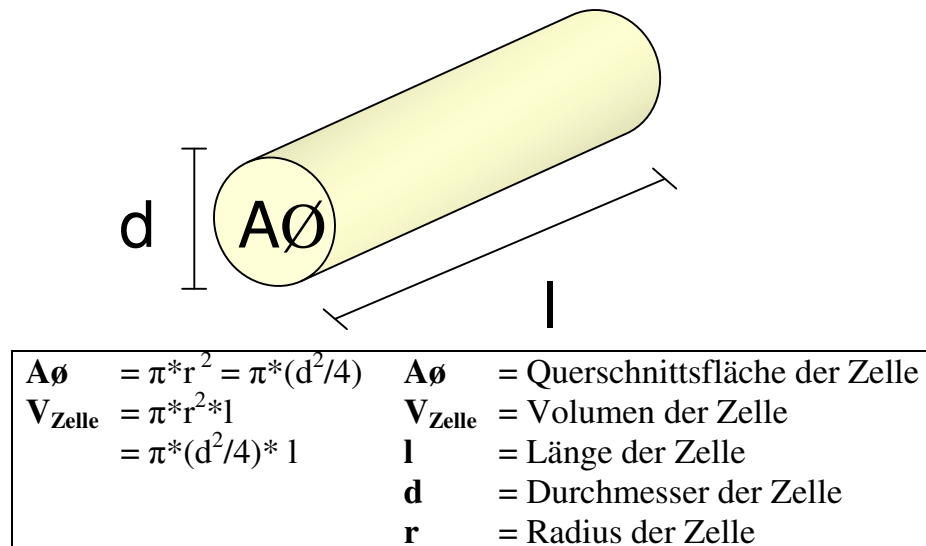
## **2.6 Biochemische und zellbiologische Methoden zur Bestimmung der Hypertrophie**

### **2.6.1 Hypertrophieparameter**

Unter Hypertrophie versteht man die Größenzunahme eines Organs oder Gewebes durch Zellvergrößerung bei konstanter Zellzahl, wobei es zu einem Nettogewinn an zellulärem Protein kommt. Sie ist damit gegenüber der Hyperplasie abzugrenzen, die mit einer Erhöhung der Zellzahl einhergeht. Während einer Hypertrophie kommt es zu spezifischen qualitativen Veränderungen in der Genexpression und des Zellphänotyps (SWINGHEDAUW, 1990; VAN BILSEN & CHIEN, 1993). Parameter hypertrophen Zellwachstums sind die Zunahme des Myozytenvolumens, der Proteinbiosynthese sowie des mRNA- und rRNA-Gehalts.

### **2.6.2 Ermittlung der Zellgröße**

Hypertrophie in Kardiomyozytenkultur wird als Volumenzunahme einzelner Zellen definiert (SCHLÜTER ET AL., 1995). Das Zellvolumen von adulten Kardiomyozyten wurde mittels eines Phasenkontrast-Mikroskops und einer damit verbundenen CCD-Videokamera dokumentiert. Die Zellen wurden dazu zunächst 24h mit oder ohne Stimulation bzw. entsprechender Inhibitoren der Hypertrophie inkubiert. Anschließend wurden pro Kulturbedingung 80-160 Zellen manuell wie folgt ausgewertet: graphisch wurde die Länge und Breite der einzelnen Zellen ermittelt. Da Kardiomyozyten annäherungsweise eine zylindrische Geometrie besitzen, konnte zur Bestimmung des Volumens und der Querschnittsfläche von folgenden Formeln ausgegangen werden:



**Abbildung 6: Formelsammlung zur Bestimmung der Kardiomyozytenquerschnittsfläche und des Zellvolumens unter der Annahme, dass die Herzmuskelzelle ein Zylinder darstellt.**

### **2.6.3 Bestimmung der Proteinbiosynthese anhand der Inkorporation von L-[<sup>14</sup>C]-Phenylalanin**

Eine andere bereits länger etablierte Hypertrophie-Messung beruht auf der Ermittlung der Proteinbiosynthese durch den Einbau von radioaktiv markierten Aminosäuren. In der überwiegenden Anzahl wurde als Aminosäure Phenylalanin bei adulten Kardiomyozyten gewählt, da diese von Kardiomyozyten nicht metabolisiert wird, sondern ausschließlich der Synthese von Proteinen dient (MORGAN & BAKER, 1991). Der Einbau von radioaktivem Phenylalanin eignet sich daher zur Quantifizierung der Proteinbiosynthese in adulten Kardiomyozyten. In der vorliegenden Arbeit wurde eine modifizierte Methode nach PINSON ET AL. (1993) verwendet.

Die Zellen wurden dazu für bis zu 24h mit 0,2µCi/ml radioaktiv markiertem Phenylalanin versetzt. Während dieser Zeitspanne steigt der Einbau der radioaktiven Aminosäure linear zur Hypertrophie an (SCHLÜTER & PIPER, 1992). Zusätzlich zu radioaktivem Phenylalanin enthielt das Inkorporationsmedium, bestehend aus CCT-Joklik-Medium, einen starken Überschuss an nicht radioaktivem Phenylalanin (0,3mM). Somit sollte eine Absättigung des membranären Aminosäuretransporters erreicht und eine gleichmäßige zelluläre Verfügbarkeit des radioaktiven Phenylalanins gewährleistet werden.

Die Inkorporation wurde abgestoppt, indem zunächst die Zellen dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen und dann mit 1ml 10%iger Trichloressigsäure (TCA) (w/v) bei 4°C über Nacht versetzt wurden. Die Präzipitate wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und

anschließend mit 1,25ml 0,2N Natronlauge (NaOH), die zusätzlich 0,01% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) enthielt, für zwei Stunden im Brutschrank aufgelöst. 500µl des Zellhydrolysats wurden mit 5ml Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold MV) versetzt und die Zerfallsereignisse pro Minute (dpm) über einen Zeitraum von 3min im Flüssig-Szintillationszähler Tri-Carb 2900TR (Packard, Frankfurt a. M) bestimmt. Als Nullabgleich wurde ein Leerwert der entsprechenden Menge an Lösungsmittel durchgeführt.

Um zu überprüfen, ob die zelluläre Aufnahme und Verfügbarkeit von [<sup>14</sup>C]-Phenylalanin in allen Versuchsbedingungen äquivalent war, wurde das Vorhandensein der radioaktiv markierten Aminosäure im Bestand der zur Proteinsynthese benötigten Vorläufermoleküle (*Precursor-Pool*) radioaktiv nachgewiesen. Der *Precursor-Pool* entspricht dabei der radioaktiven Phenylalanin-Fraktion, die zwar von den Kardiomyozyten aufgenommen, aber nicht in Proteine umgesetzt wurde (MCDERMOTT ET AL., 1989).

Zur radioaktiven Quantifizierung des *Precursor-Pools* wurden 500µl des zur Proteinfällung verwendeten TCA-Überstandes mit 5ml Szintillatorflüssigkeit versetzt und die Zerfallsereignisse pro Minute (dpm) bestimmt, sowie nachträglich ebenfalls ein Leerwert abgezogen. Die Proteinbiosynthese wurde dann als Ratio von zellulärem Protein zu DNA-Gehalt (für dessen Bestimmungsmethode siehe 2.6.5) an Hand folgender Formel (Abbildung 7) berechnet. In der Regel wurden alle Ergebnisse in Prozent (%) der Kontrolle angegeben.

$$\text{Protein-Neusynthese} = \frac{\left( \frac{\text{Zerfälle}_{\text{Hydrolysat}} - \text{Zerfall}_{\text{NaOH}}}{\text{Zerfälle}_{\text{Precursor}} - \text{Zerfall}_{\text{TCA}}} \right)}{\text{DNA [ng]}}$$

**Abbildung 7: Formel zur Berechnung der Phenylalanininkorporation in adulten Kardiomyozyten.**

#### **2.6.4 Bestimmung der RNA-Synthese anhand der Inkorporation von [<sup>14</sup>C]-Uridin**

Hypertrophie in Kardiomyozyten zeichnet sich nicht nur durch eine Zunahme der Expression von mRNA diverser Kardiomyozytenproteine aus. Daneben wird unter Hypertrophie-Induktion der gesamte ribosomale Translationskomplex und damit der Gehalt an ribosomaler RNA (rRNA) verstärkt gebildet. Beide, mRNA und rRNA, lassen sich durch den Einbau von radioaktiv markiertem Uridins ermitteln (KANEVSKIJ ET AL., 2002).

Das Inkorporationsmedium zur Messung der RNA-Neusynthese setzte sich aus CCT-Joklik-Medium und [U<sup>14</sup>C]-Uridin (0,1µCi/ml) zusammen. Analog der Messung der Proteinbiosynthese wurden die Kardiomyozyten 24h inkubiert (PINSON ET AL., 1993),

anschließend dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen und danach mit reinem Ethanol bei -20°C über Nacht versetzt.

Am folgenden Tag wurden die Präzipitate mit 1,25ml 0,2N NaOH, die zusätzlich 0,01% (w/v) SDS enthielt, für zwei Stunden im Brutschrank aufgelöst. Ein Aliquot (500µl des Zellhydrolysats) wurde mit 5ml Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold MV) versetzt und die Zerfallsereignisse pro Minute (dpm) über einen Zeitraum von 3min bestimmt. Aus einem anderen Aliquot wurde fluorometrisch DNA bestimmt (2.6.5). Zusätzlich wurde ein Leerwert mit der entsprechenden Menge an NaOH ermittelt, der nachträglich von den Messwerten der Proben subtrahiert wurde.

Der Einbau von radioaktivem Uridin in RNA wurde als Verhältnis von zellulärer RNA zu DNA-Gehalt mittels folgender Formel berechnet:

$$\text{RNA-Neusynthese} = \left( \frac{\text{Zerfälle}_{\text{Hydrolysat}} - \text{Zerfall}_{\text{NaOH}}}{\text{DNA [ng]}} \right)$$

**Abbildung 8: Formel zur Berechnung der Uridininkorporation in adulten Kardiomyozyten.**

Alle Ergebnisse wurden anschließend in Prozent auf Kontrollwerte ohne Hypertrophie-Stimulus bezogen.

### 2.6.5 Bestimmung des DNA-Gehalts

Da Hypertrophie die Größenzunahme einzelner Zellen ohne Zellteilung ist, bleibt die Menge an zellulärer DNA im Gegensatz zum zellulären Protein und RNA-Gehalt konstant (SCHWARZFELD & JACOBSON, 1981). Eine DNA-Quantifizierung nach einer modifizierten Methode von RITCHIE ET AL. (1993) lieferte damit eine wichtige Größe, auf die RNA- und Protein-Neusynthese Sinnvollerweise bezogen wurden.

In einer 96-Well Platte wurden 20µl der mit NaOH/SDS-aufgelösten Zellbestandteile (2.6.3 oder 2.6.4) mit 18,9µl 0,2N Salzsäure (HCl) annähernd neutralisiert und anschließend mit 80µl Tris-Acetat-Puffer (TAE; pH 8,0), sowie 100µl eines 1:200 in TAE-Puffer verdünnten PicoGreen-Reagenz (Molecular Probes) versetzt. Nach Schütteln und Inkubation für 5min unter Lichtausschluss wurde die Fluoreszenz des an die DNA gebundenen PicoGreen-Fluoreszenzfarbstoffes bei einer Anregung von 480nm und einer Absorption von 520nm im Multi-Detektion Plattenleser POLARstar (Firma BMG) ermittelt. Zur Quantifizierung wurden

die gewonnenen Messwerte mit einer Eichkurve verrechnet, die sich aus einer Referenz-DNA (Kalbsthymus) in Konzentrationen zwischen 0 und 100ng/ml zusammensetzte.

## **2.7 Proteinchemische Methoden**

### **2.7.1 Zellulärer Aufschluss**

Die intakten Kardiomyozyten wurden einmal mit PBS gewaschen, danach auf Eis mit 250µl denaturierenden Lysispuffers (10 mM Tris, 1% (w/v) SDS, 1mM Natrium-ortho-Vanadat, pH 7,4 und je 10ml Zusatz einer Complete-Mini-Tablette (Roche)) versetzt und mechanisch von der Kulturschale gelöst. Der Zusatz von Natrium-ortho-Vanadat im Lysispuffer diente zur Hemmung von Phosphatasen, um damit die nachträgliche Dephosphorylierung der in der Arbeit gemessenen Signalproteine zu vermeiden.

Die Viskosität des Zelllysats wurde durch 5-sekündige Beschallung mit einem Sonoplus-Ultraschallgerät (Bandelin Electronic) minimiert. Zur Bestimmung des Proteingehaltes (2.7.3) wurde ein Aliquot (ca. 20µl) entnommen. Die übrige Lösung wurde dann im Verhältnis von 1:5 mit 5-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer (2,5 M Tris, 8% (v/w) SDS, 20% (v/w) Glycerin, 5% (v/w) 2-Mercaptoethanol und 0,05% (v/w) Bromphenolblau; pH 6,8) versetzt und vor dem Westernblot (siehe 2.7.5) für 20min bei 70°C denaturiert. Nicht verwendete Aliquots wurden bei -20°C bis zur späteren Verwendung eingefroren.

### **2.7.2 Membranpräparation aus adulten Kardiomyozyten**

Zur Untersuchung verschiedener peripherer (wie z.B. PKC) und integraler Membranproteine (z.B. NHE1) wurden Kardiomyozyten im basalen oder stimulierten Zustand, wie im folgenden beschrieben, in eine membranäre und zytosolische Fraktion aufgetrennt.

Die Kardiomyozyten wurden einmal mit eiskaltem PBS gewaschen, in 500µl eines hypotonen Puffer (bestehend aus 10mM HEPES, 1mM EDTA, 1mM EGTA und 2mM DTT, pH 7,6) mit einem Zellkultschaber abgeschabt und in ein auf Eis gestelltes Eppendorffgefäß überführt. Nach einer 5-sekündigen Homogenisierung mittels Ultraschall, wurde die Suspension bei 4°C und 280000xg (TL-100 Ultrazentrifuge, Beckman) 30min zentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation enthielt den zytosolischen Anteil der Zellen und wurde aliquotiert. Das verbliebene Membranpellet wurde in 250µl eines detergenzhaltigen Puffers (Zusammensetzung: 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM DTT, 1% (v/v) Triton-X-100 und

einer Complete Mini-Tablette (Roche, je 10ml; pH 7,6) aufgenommen und für 5 Sekunden mit Ultraschall behandelt. Nach erneuter Zentrifugation bei 4°C und 280000xg für 30min befanden sich die Membranproteine in gelöster Form im Überstand, welcher nach Abnahme aliquotiert wurde. Je ein Aliquot der zytosolischen und membranären Fraktion wurde für eine Lowry-Proteinbestimmung verwendet, andere wurde wie im Punkt 2.7.1 beschrieben mit 5xLämmli-puffer versetzt und bei 70°C für 20min denaturiert. Nicht sofort benötigte Aliquots wurden vor der weiteren Verwendung bei -20°C zwischengelagert.

### **2.7.3 Proteinbestimmung nach Lowry**

Zur Proteinbestimmung wurde standardmäßig die Methode nach Lowry (LOWRY ET AL., 1951) angewandt. Das Prinzip der Quantifizierung beruht auf einer Oxidation der Proteine durch ein Oxidationsmittel (Kupfer-(I)-tartrat), wodurch es zu einer charakteristischen Blaufärbung der Lösung durch die Reduktion des Folin-Reagenz kommt. Diese kann dann kolorimetrisch ausgewertet werden. Das hier verwendete Reagenz (*D<sub>c</sub> Protein Assay Kit*, BioRad) ermöglicht eine sensitive, stabile Bestimmung der Proteinkonzentration. Nach Herstellerangaben wurde in Dreifachbestimmungen je 5µl des unter 2.7.1 oder 2.7.2 gewonnenen Proteins in einer Mikrotiterplatte mit den entsprechenden Reagenzien versetzt und nach 5-minütiger Inkubation die Absorption bei 750nm in einem Mikrotiter-Plattenphotometer (Molecular Devices) gemessen. Zur Quantifizierung der Proteinkonzentration in den Proben wurden die ermittelten Messwerte gegen eine Standardkurve von Rinderserumalbumin (BSA) verrechnet, die einen Konzentrationsbereich von 0,0 bis 1,5mg/ml abdeckte.

### **2.7.4 Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die am häufigsten verwendete Methode der Proteinelektrophorese ist die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS). Dabei werden denaturierte Proteinuntereinheiten im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt. Durch Variation der Gelzusammensetzung oder dem Einsatz von Konzentrationsgradienten kann die Auftrennung an das erwartete Molekulargewicht angepasst werden. In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 3 unterschiedliche Gelelektrophoresesysteme verwendet.



Bei größerer Probenanzahl wurde ein Fertigellsystem der Firma BioRad (Criterion) mit bis zu 26 Taschen pro Gel verwendet. Dieses beruht auf der von LAEMMLI bereits 1970 beschriebenen Methode mit Glycin als Leition. Zwischen 10µl bis 20µl (entsprechen 5-50µg Protein) der zuvor denaturierten Proben wurde in die jeweiligen Kammern eines 4-15%-BisTris-Gradientengels pipettiert. Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde ein Proteinmarker, der Markerproteine mit definiertem Molekulargewicht in der Größenordnung von 10-200kDa enthielt, aufgetragen und darüber die Größe der gesuchten Proteine bestimmt. Nach Herstellerangaben wurde der Tris/Glycin/SDS- Laufpuffer 1:10 mit Bidest Wasser verdünnt und dem System zugefügt. Während des Eintritts der Proteine in das Sammelgel lag für ca. 10 min eine Spannung von 150V an, zur elektrophoretischen Trennung der Proteine wurde die Spannung auf 200V erhöht. Die Gesamtlaufzeit der Elektrophorese betrug etwa 1h.

Bei kleineren Probenanzahlen wurde das Fertigellsystem NuPAGE® Novex Bis-Tris Gels der Firma Invitrogen mit bis zu 17 Taschen verwendet. Im Gegensatz zu der alten LAEMMLI-Methode ist hier nicht Glycin sondern MOPS (3-[N-Morpholino]propane-sulfonic acid) das Leition. Analog zur BioRad-Methode wurden auch hier die denaturierten Proben und die Markerproteine bei einer Spannung von 150V (Sammelgel) und 200V (Trenngel) getrennt, wobei sich der Laufpuffer in dieser Methode aus einer 1:20 Verdünnung aus dem NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer mit Bidest Wasser ergab.

Untersuchungen zur Aktivierung der 42 kDa-Isoform der „*Extracellular signal Regulated Kinase*“ (ERK) wurden mit Hilfe eines dritten Fertigellsystem, bestehend aus einem 10%igen Tris-Acetat-Gel mit 10 Taschen und dem dazugehörigen Tris-Acetat-Laufpuffer der Firma Invitrogen, durchgeführt. Die SDS-Gelelektrophorese fand bei diesen Experimenten unter einer konstanten Spannung von 150V statt. Die Gelelektrophorese wurde abgebrochen, wenn der mitlaufende vorgefärbte Proteinmarker mit der 37kDa-Bande das Ende der Trennstrecke des Gels erreichte. Diese Vorgehensweise erwies sich als vorteilhaft, um phosphoryliertes von nicht-phosphoryliertem ERK-Protein (ca. 40 kDa) besser zu unterscheiden.

Unabhängig von den eingesetzten Gelelektrophorese-Systemen, erfolgte der anschließende Western Blot aller getrennten Proteine nach einer einheitlichen Methode.

### **2.7.5 Western Blot**

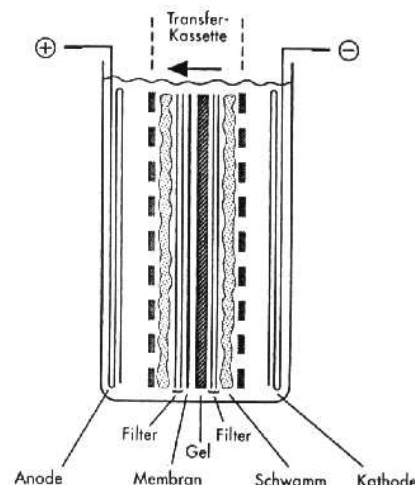
Der Western Blot gliedert sich in zwei Arbeitsschritte. Im ersten Schritt werden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteinbanden im elektrischen Feld in einem Naßblot-Verfahren auf speziell darauf ausgerichtete Kunststoffmembranen transferiert (Transferschritt). Im zweiten Schritt erfolgt dann die Bindung und Detektion von Antikörpern (immunologischer Nachweis) an die transferierten Proteine auf den Kunststoffmembranen.

### **2.7.6 Elektrotransfer**

Zum spezifischen Nachweis von Proteinen und Phosphoproteinen wurden diese nach der SDS-Gelelektrophorese durch Anlegen eines homogenen, elektrischen Feldes aus dem Gel auf eine speziell darauf optimierte Nitrozellulosemembrane (PALL) transferiert und immobilisiert. Beim immunologischen Nachweis von Proteinen wurde diese Methode zum ersten Mal von TOWBIN ET AL. (1979) angewandt, basierend auf der Idee, dass die so transferierten Proteine für Antigen-Antikörper-Reaktionen auf der Membran leichter zugänglich sind im Vergleich zum Gel.

Vor dem Elektrotransfer wurde die Nitrozellulosemembran äquilibriert, indem sie zuerst für einige Minuten mit Wasser gewaschen und danach für mindestens zehn Minuten im jeweiligen Transferpuffer belassen wurde. Für die Gelsysteme der Firma Invitrogen wurde dafür der entsprechende NuPAGE® Transfer Buffer 1:20 mit Bidest verdünnt und von der Firma BioRad stand ein vorgefertigter 10-fach Tris/Glycin Transferpuffer zur Verfügung, der vor Gebrauch 1:10 mit bidestilliertem Wasser verdünnt wurde. Beiden Transferpuffern wurde zusätzlich 10% (v/v) Methanol beigelegt. Die verwendeten Filterpapiere und Schaumstofflagen wurden nur kurz in Transferpuffer getränkt. Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurde das Gel von den Plastikplatten abgenommen und für 10 min im Transferpuffer äquilibriert.

Die einzelnen Lagen wurden nacheinander unter Vermeidung von Luftblasen in einer Art „Sandwich“ geschichtet und anschließend in spezifische Naßblot-Apparaturen der jeweiligen Firmen Invitrogen oder BioRad, wie in Abbildung 9 gezeigt, eingebaut.



**Abbildung 9: Schema einer Naßblot-Apparatur mit Sandwichaufbau.**

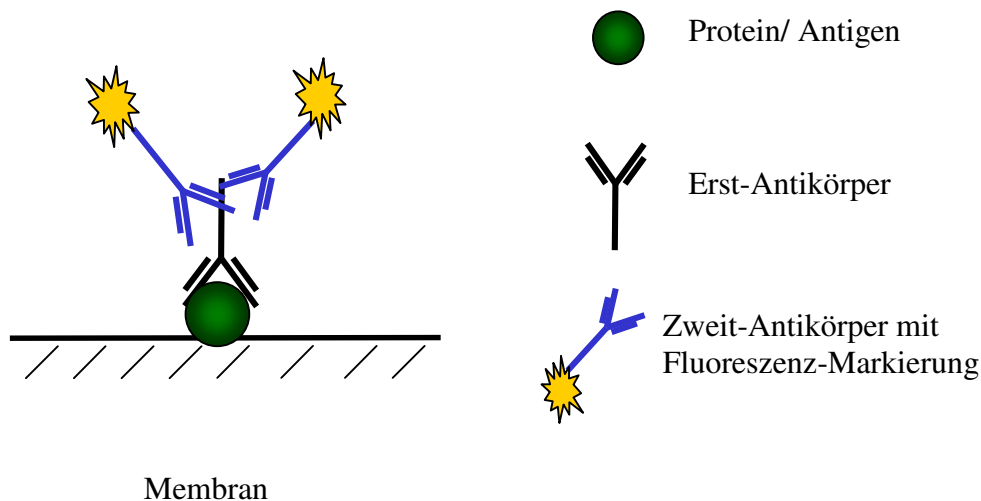
Unabhängig von den verwendeten Geltypen und Naßblot-Apparaturen erfolgte der Transfer bei einer Stromstärke von 200mA und einer Dauer von 1-2h.

Im Anschluss an den Transfer wurde die Membran der Naßblot-Apparatur entnommen und mittels einer modifizierten Methode nach KOHN (1958) zur Überprüfung des Transfers, reversibel mit Ponceau-S-Lösung angefärbt. Die Intensität dieses an Protein bindenden roten Farbstoffes gab die lokale Effizienz des Elektrotransfers wieder.

Zur Färbung wurde dazu die Membran 5min mit einer 0,2%igen (w/v) Ponceau-S-Lösung leicht geschüttelt. Durch kurzes Waschen mit PBS konnte der unspezifische Hintergrund abgewaschen werden. Nach einfacher optischer Begutachtung der Transfereffizienz konnte durch weiteres 30-minütiges Waschen die gesamte Membran vor den weiteren immunologischen Nachweisen komplett entfärbt werden.

### **2.7.7 Immunochemischer Nachweis durch Antikörperbindung an elektrotransferierte Proteine**

Bei der immunochemischen Detektion von Proteinen wurde eine sogenannte „*Double-Sandwich*“-Technik angewandt, bei der ein proteinspezifischer Antikörper an das elektrotransferierte Protein gebunden und über einen Zweitantikörper nachgewiesen wird. Abbildung 10 zeigt den schrittweisen Aufbau eines solchen „*Sandwiches*“:



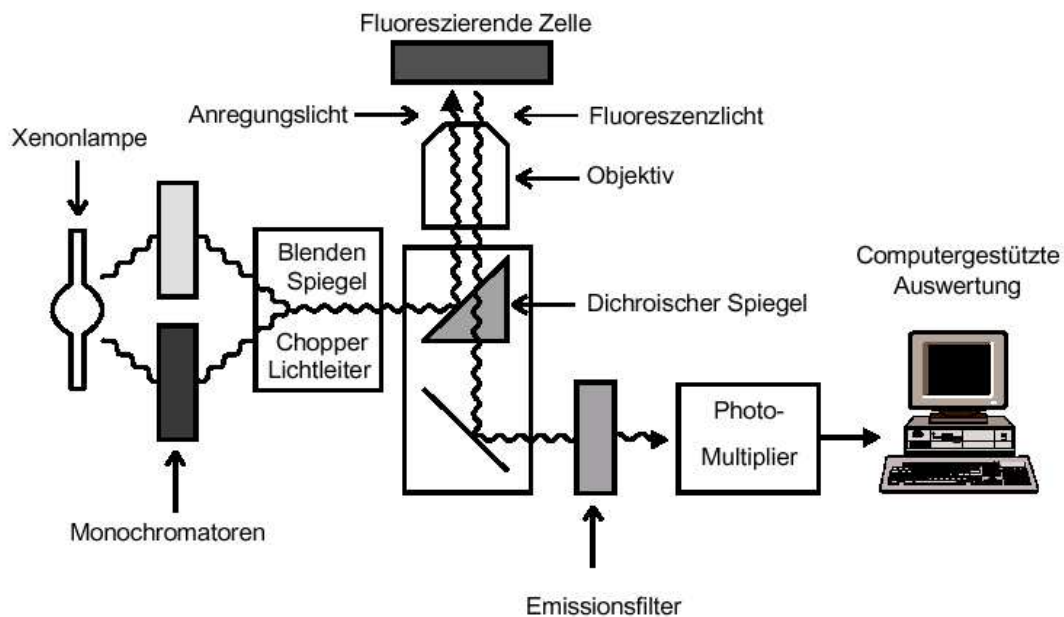
**Abbildung 10: Aufbau einer „Sandwich“-Technik.** Der spezifische Erstantikörper bindet zunächst an das Protein und wird seinerseits durch einen sekundären, mit Alexa Fluor® 680-fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper erkannt.

In dieser Arbeit wurde eine neuere Methode der Detektion der gebundenen Antikörper mittels eines Li-Cor Odyssey™ Gerät angewandt. In dieser Methode diente der Antigen-spezifische Erstantikörper der Identifikation des gesuchten Proteins und wurde dann durch einen sekundären, fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper direkt über Fluoreszenzanregung mittels eines Diodenlasers detektiert.

Zur Durchführung des immunochemischen Nachweises wurde die Membran 1h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln mit Blockierungslösung (Li-Cor Blocking Buffer, 1:2 mit PBS) versetzt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Nach der Inkubation der Membran für 60min bei Raumtemperatur mit einer Verdünnung des Erstantikörpers in Blockierungslösung, zusätzlich versetzt mit 0,25%-TWEEN-20, wurden die nicht gebundenen Antikörper durch viermaliges Waschen für 5min mit PBST entfernt. Die Reaktion mit dem Zweitantikörper erfolgte anschließend in einer Verdünnung nach Herstellerangaben (üblicherweise 1:2500) in gleicher Blockierungspuffer-Zusammensetzung wie bereits beim Erstantikörper beschrieben. Wiederum wurden unspezifisch gebundene Antikörper durch viermaliges Waschen für 5min mit PBST entfernt. Im Anschluss wurde die Fluoreszenz auf der Nitrocellulosemembran mit Hilfe des Odyssey™ Scanners angeregt, gemessen und anschließend mit der dazugehörigen Software ausgewertet. Die jeweiligen Signalintensitäten wurden auf die des „Housekeeping“-Proteins  $\beta$ -Aktin normalisiert. Dieses Protein erwies sich in Kardiomyozyten unter Hypertrophie als nicht reguliert und diente dazu, mögliche Variabilitäten in der Protein-Menge, die durch Unterschiede in der Geltaschenbeladung oder durch leicht differierende Transfereffizienzen hervorgerufen werden können, zu eliminieren.

## 2.8 Messung von intrazellulären Calciumionen

Um den Einfluss von SEA0400 auf die Aktivität des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers (NCX) zu bestimmen, wurde dessen Aktivität indirekt über intrazelluläre Calciumionen bestimmt. Die Calciummessung beruhte auf der bereits auf Kardiomyozyten adaptierte Methode durch den Calcium-sensitiven Fura-2-Fluoreszenzfarbstoff nach LADILOV ET AL. (1999). Die apparative Voraussetzung für die Messungen der intrazellulären Calciumionen ist in der folgenden Abbildung dargestellt (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Schemadarstellung der Messanlage.**

Die Messung erfolgte mit Hilfe eines inversen Mikroskops, welches in ein entsprechendes Fluoreszenzsystem (AR-Cation Measurement „SPEX<sup>®</sup>“) eingebunden war. Mit Hilfe von Monochromatoren konnte das Anregungslicht der UV-Lampe entsprechend dem Anregungsspektrum des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes gefiltert werden. Die somit ausselektierten Wellenlängen erreichten über Spiegel und Lichtleiter die Kardiomyozyten und führten dort zur Anregung des Farbstoffes. Das Fluoreszenzlicht gelangte durch einen dichroitischen Spiegel und einen Emissionsfilter in den Photomultiplier des SPEX<sup>®</sup>-Systems. Das entstehende Signal wurde aufgezeichnet und im Anschluss mit der dazugehörigen Software (DM3000CM) ausgewertet.

Zur Bestimmung der intrazellulären Calcium-Konzentrationen wurden die Zellen für 20 Minuten bei 37°C mit Fura-2 (4µM) in CCT-Joklik-Medium beladen. Am Ende der Beladung erfolgte ein zweimaliges Waschen der Zellen mit CCT-Joklik-Medium und eine

Nachinkubationszeit von 30 Minuten. Fura-2 wurde bei den Wellenlängen 340nm und 380nm angeregt, das Emissionsmaximum lag bei 510nm.

Um in den Kardiomyozyten den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher im sogenannten „Reverse Mode“ zu aktivieren (LADILOV ET AL., 1999), wurde die extrazelluläre Natriumkonzentration isotonisch durch N-Methyl-D-glucamin ausgetauscht. Etwa 3 – 5 Minuten nach Einbau der Glasplättchen in die Apparatur wurde mit der Perfusion mit  $\text{Na}^+$ -freiem aber  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Medium begonnen (Zusammensetzung: 145mM N-Methyl-D-glucamin, 2,6mM KCl, 1,2mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,2mM  $\text{MgSO}_4$ , 15mM HEPES, 11mM Glucose, 1mM  $\text{CaCl}_2$ ). Die Daten der Fura-2-Messungen wurden als Verhältniszahl (Ratio) der Emissionen (340nm/380nm) angegeben. Zur Auswertung wurde der initiale Calciumioneneinfluss herangezogen.

## **2.9 Molekularbiologische Methoden**

### **2.9.1 Genexpressionsbestimmung**

Die PCR (polymerase chain reaction; SAIKI ET AL., 1985) stellt ein enzymatisches *in-vitro*-Verfahren zur selektiven Anreicherung von Nukleinsäure-Bereichen definierter Länge und Sequenz aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen dar. Diese Methode ermöglicht die Amplifikation sehr geringer Nukleinsäuremengen aus den unterschiedlichsten Ausgangsmaterialien. Prinzipiell wurde zunächst aus dem Ausgangsmaterial RNA isoliert, diese dann in cDNA (komplementäre DNA) umgeschrieben (Reverse Transkription, RT) und zur PCR weiter verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde stets eine Zwei-Schritt-PCR durchgeführt, d.h. RT und PCR liefen in getrennten Reaktionen voneinander ab.

### **2.9.2 Präparative RNA-Isolierung**

Die RNA-Isolierung erfolgte nach einer modifizierten Methode von CHOMCZYNSKI ET AL., die bereits 1987 beschrieben wurde.

Zur Isolation der RNA wurden die Zellen mit 200µl Trizol-Reagenz versetzt. Anschließend wurden die Trizol-Lösungen von je fünf gleichbehandelten Kulturschalen (Typ: Falcon 3004) manuell mit einem Zellschaber geerntet und in einem Eppendorfgefäß vereinigt.

Die gewonnene Trizol-Lösung wurde bis zur vollständigen Auflösung der Zellen mit Hilfe eines Vortex-Schüttlers (MS1 Minishaker) für 30 Sekunden stark geschüttelt, mit 200µl Chloroform versetzt und erneut gut durchmischt bis eine milchig-weiße Emulsion entstand.

Die folgende Zentrifugation bei 4°C und 20800g (Centrifuge 5417R, Eppendorf) für 15min trennte die gesamt-RNA von DNA und Proteinen. Erkennbar war die Auftrennung bzw. Bildung von insgesamt drei Phasen, wovon die klare obere die gesamt-RNA enthielt. Die obere Phase wurde nun vorsichtig abgenommen (ca. 600µl) und in ein neues, steriles Eppendorfgefäß überführt. Zur Fällung der RNA wurden 600µl Isopropanol dem Eppendorfgefäß zugesetzt, kurz geschüttelt und für mindestens 20min bei -20°C inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation für 15min bei 4°C und 20800g, konnte die pelletierte RNA durch vorsichtiges Abnehmen des Überstandes gewonnen werden. In einem weiteren Schritt wurden die RNA mit 300µl 80%igen Ethanol gewaschen und anschließend, wie im vorherigen Schritt beschrieben, zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die resultierende RNA wurde kurz an der Luft getrocknet, in 10-30µl sterilem bidest Wasser resuspendiert und quantitativ photometrisch bestimmt. Dazu wurden 2µl der RNA-enthaltenden Lösung mit 48µl bidest Wasser in einer speziellen Plastikkuvette (Uvette, Eppendorf) verdünnt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt. Um die Effizienz der Proteintrennung zu überprüfen, wurde die Probe zusätzlich bei einer Wellenlänge von 280nm gemessen. Das errechnete Verhältnis der beiden Extinktionswerte(260nm/280nm) lag bei einer sauberen RNA-Lösung zwischen 1,6 und 2,1.

### **2.9.3 Entfernung genomischer DNA**

Bei der Isolierung von RNA mittels Trizol können Kontaminationen mit genomischer DNA auftreten. Zur Entfernung dieser genomischer DNA wurde ein kommerziell erwerblicher *DNA-free™ Kit* von Ambion nach Herstellerangaben angewandt.

In einem Reaktionsansatz von 25µl wurde 1µg RNA mit 5µl 10xDNase-I-Puffer und 1µl DNase-I-Reagenz für 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 5µl DNase-Inaktivierungsreagenz hinzugefügt und die Lösung gut gemischt. Nach 2min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Suspension 1min bei 20800g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches, RNA-freies Eppendorfgefäß überführt und bei -80°C gelagert.

### **2.9.4 Reverse Transkription**

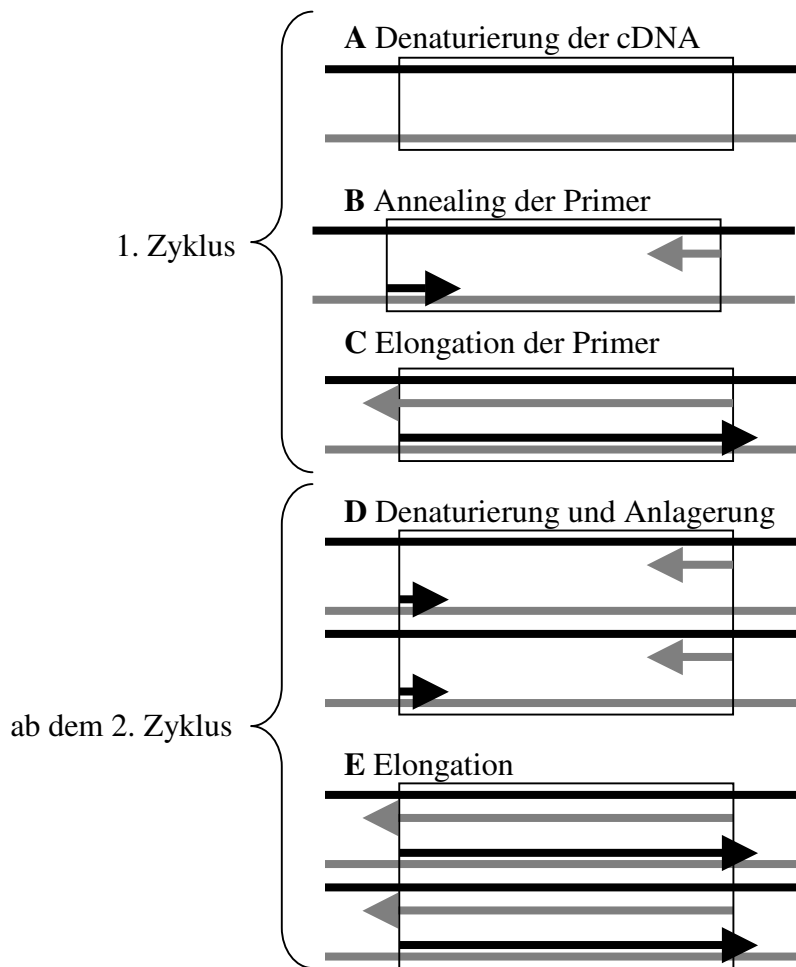
Bei der reversen Transkription (RT) wird RNA enzymatisch in cDNA umgeschrieben. Die cDNA-Synthese erfolgte standardmäßig nach Herstellerangaben mit dem *Omniscript™ Reverse Transcriptase Kit* von Qiagen. Es wurde je 1µg gesamt-RNA pro Ansatz 5min bei

65°C denaturiert und 2min auf Eis gekühlt. Anschließend wurden sowohl 20pmol pDN6-Primer als auch Oligo-dT-Primer, 10mM dNTP-Mix, 40U RNasin, 2µl des 10xRT-Puffers sowie die reverse Transkriptase zupipettiert und auf 20µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde vorsichtig gemischt und 1h bei 37°C inkubiert. Bis zur späteren Verwendung konnten die Proben bei -80°C tiefgefroren werden.

### **2.9.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

Unter einer Polymerase-Ketten-Reaktion, im englischen „*polymerase chain reaction*“ (PCR), versteht man die gezielte Amplifikation bestimmter DNA-Sequenzbereiche, die durch die Wahl spezifischer Primer festlegbar sind. Diese Methode kann sowohl qualitativ als auch quantitativ eingesetzt werden. Das PCR-Amplifikat wird dabei am Endpunkt der PCR quantifiziert. Mit Hilfe thermostabiler DNA-Polymerasen werden DNA-Einzelstränge zu komplementären Doppelsträngen ergänzt. Die eigentliche Methode gliedert sich in mehrere Schritte (Abbildung 12):





**Abbildung 12: Schematische Darstellung einer PCR.** In dieser PCR wird ein spezifisches Genfragment (Rechteck) amplifiziert. Der erste PCR-Zyklus erstreckt sich von A bis C. Der zweite und alle nachfolgenden Zyklen sind durch D und E sowie eine erneute Denaturierung (nicht gezeigt) dargestellt.

Während der initialen Denaturierungsphase werden sowohl Sekundärstrukturen als auch gebildete Primerdimere durch Hitze (5-10min bei 95°C, *Hot Start* und Aktivierung der Polymerase) aufgeschmolzen. Daran schließen sich dann 30-40 Zyklen folgender drei Reaktionsschritte an: Im ersten Schritt wird der zu amplifizierende Doppelstrang der DNA in Einzelstränge durch 30-60 sekundiges Erhitzen auf 94°C aufgetrennt. An diese einzelsträngige Matrizen lagern sich im zweiten, sogenannten „*Annealing*“-Schritt bei niedrigerer Temperatur von 50-75°C und 30 bis 60 Sekunden Dauer, kurze synthetische Oligonukleotide (Primer) als Startermoleküle an, die komplementär zu den Randbereichen der zu amplifizierenden Nukleinsäuren sind. Vom 3'-Ende dieser Oligonukleotide ausgehend, findet im dritten sogenannten Elongationschritt (häufig bei 72°C) die Synthese mit Hilfe einer DNA-Polymerase statt.

### **2.9.6 Auswahl spezifischer Primer für die Echt-Zeit-PCR**

Die Optimierung erfolgte über die Auswahl von mindestens 6 Primerpaarkombinationen je untersuchtes Gen. Diese bestanden in der Regel aus 19-21 Desoxynukleotiden mit ca. 50%igen Gehalt an Guanin- und Cytosin. Hierdurch erhielten die verwendeten Primerpaare einen ähnlichen Schmelzpunkt, der vorzugsweise für alle bei 57°C gewählt wurde. Außerdem wurden die Zyklenzahlen so gewählt, dass der Anstieg der Amplifikation im linearen Bereich lag.

Zur Expressionsanalyse der Primer wurde standardmäßig eine PCR mit dem *HotStarTaq<sup>TM</sup>*PCR-Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Hierzu wurden 0,5µl cDNA und 24,5µl des hergestellten PCR-Ansatzes aus Enzym-, Puffer- und dNTP-Mengen (nach Herstellerangaben) in eine PCR-Mikrotiterplatte (BioRad) überführt, gut gemischt und bei einer für die jeweiligen Primer spezifischen Zyklenzahl im iCycler (BioRad) die Polymerase-Reaktion durchgeführt. Zunächst wurde ein Temperaturgradient im iCycler programmiert, durch den die optimale Temperatur der Reaktion bestimmt wurde. In einem weiteren Optimierungsschritt erfolgte durch MgCl<sub>2</sub>-Titration (1-6mM) die Bestimmung der optimalen Magnesiumionen-Konzentration unter Beibehaltung der Zyklusbedingung der PCR.

Zur Amplifikation wurde der PCR-Ansatz im iCycler, letztendlich für alle untersuchten Gene unter den gleichen Bedingungen optimiert, nach folgendem Schema temperiert:

Zyklus	Denaturierung	Annealing	Polymerasen-Reaktion
1	95°C; 14min (Polymeraseaktivierung)		
2-36	94°C, 20sek	57°C, 30sek	72°C, 30sek
37			72°C, 5min

**Abbildung 13: Schema der Reaktionsparameter der PCR.**

Nach Ablauf der PCR-Reaktion wurden die PCR-Produkte in einem 2%igen (w/v) Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (2.11.1). Die Beurteilung der PCR-Amplifikation erfolgte visuell. Saubere Amplifikate ergaben eine definierte Bande bei der erwarteten Größe ohne schmierigen Hintergrund. Kam eine Primerkombination in Frage, wurde die betreffende Bande aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mittels dem *QIAquick<sup>TM</sup>* Gel Extraktion-Kits

nach Herstellerangaben eluiert. Die DNA wurde per PCR mit denselben Primern nachamplifiziert und erneut eluiert. Anschließend wurde die Konzentration des PCR-Amplifikates photometrisch (2.11.4) bestimmt. Mit den jeweiligen PCR-Produkten wurde eine Verdünnungsreihe (0,0002 – 20pg/20µl) pipettiert und eine PCR-Reaktion unter Echt-Zeit-Bedingungen mit den korrespondierenden Primern durchgeführt. Nachfolgend wurde eine Kalibriergerade erstellt, wobei durch die hier erhaltene Steigung (m) mit der folgenden Formel die Amplifikationseffizienz (E) berechnet werden konnte:

$$E = 10^{-1/m}$$

Die Amplifikationseffizienz gab an, um das Wievielfache das PCR-Produkt pro Zyklus vervielfältigt wurde und sollte idealerweise bei 2 liegen. Die Primerkombination, die diesem Wert am nächsten kam, wurde verwendet. In speziellen Fällen wurde auch zusätzlich eine Sequenzanalyse der Primerpaare angefertigt (siehe 2.11.5).

Folgende Primer-Kombinationen wurden neben etlichen anderen Primern über das freizugängliche Programm *Software Primer3* ([http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)) an Hand der Sequenzen ausgewählt. Die hier genannten Primer erwiesen sich als optimal für den Nachweis der entsprechenden Rattengene in Kardiomyozyten.

**Tabelle 1: Primer für die Expressionsanalyse.** Die aufgeführten Primer sind in 5' → 3' Richtung dargestellt.

Gen	Primer sense	Primer antisense	Fragmentgröße [bp]
BNP	gacaagagagagcaggacac	aaagcaggagcagaatcat	99
β-MHC	gcttgatcttgaagtagagctt	gtgtactttccagaatggagtt	132
Rock-1	catgctgctggataagtctg	tgaccaccagtcacactctc	121
EGR-1	ctccaacctcttcacctca	gctgagtaaattgggactgct	123
SHPS-1	aagttctacccaaggctct	cacatcctctctgtgagcag	153
GAPDH	ttgaggaggtgtcatattct	gagtctactggcgtcttcac	98

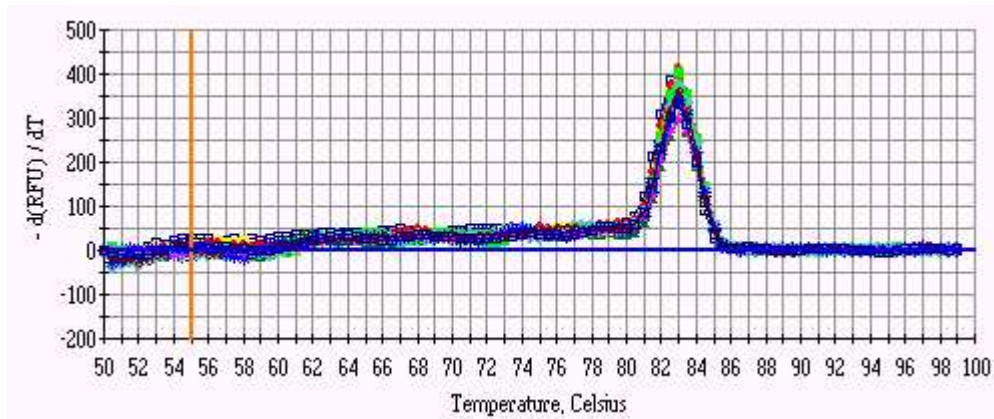
### **2.9.7 Quantitative Echt-Zeit-PCR**

Bei der Echt-Zeit-PCR, im Englischen *Real Time*-PCR genannt, handelt es sich um eine spezifische PCR-Methode, bei der die Menge an gebildetem Produkt kontinuierlich über den gesamten Zeitverlauf der Reaktionszyklen verfolgt wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde dazu ein iCycler Detektionssystem der Firma BioRad eingesetzt, indem die Menge an neu gebildeten DNA-Doppelsträngen durch Interkalation eines Fluoreszenzfarbstoffes (SYBR-Green) gemessen wird. In dieser Arbeit wurde eine relative Quantifizierung durchgeführt, wobei die Transkriptmenge eines spezifischen Gens in einer Hypertrophie-stimulierten cDNA-Probe relativ zu der einer nichtstimulierten cDNA-Probe bestimmt wurde. Weiterhin wurde die ermittelte Quantität der interessierenden RNA auf die eines nicht regulierten Gens (*housekeeping*-Gen) normalisiert. Als unter den experimentellen Bedingungen nichtreguliertes Gen wurde dazu GAPDH gewählt. Zur Analyse wurde die entsprechende cDNA in zwei PCR-Ansätze, zum einen für das entsprechende Hypertrophie-Gen, zum anderen für das *housekeeping*-Gen, aufgeteilt.

Für die Messungen wurde der *SYBR-Green PCR*-Kit der Firma Qiagen verwendet. Enzym-, Puffer- und dNTP-Mengen wurden nach Herstellerangaben in einem Reaktionsvolumen von 25µl eingesetzt. Pro Reaktionsansatz wurden 200ng cDNA (2.10.4) sowie 5µmol von jedem Primerpaar eingesetzt und die Reaktion nach dem in Abbildung 13 gezeigten Schema durchgeführt.

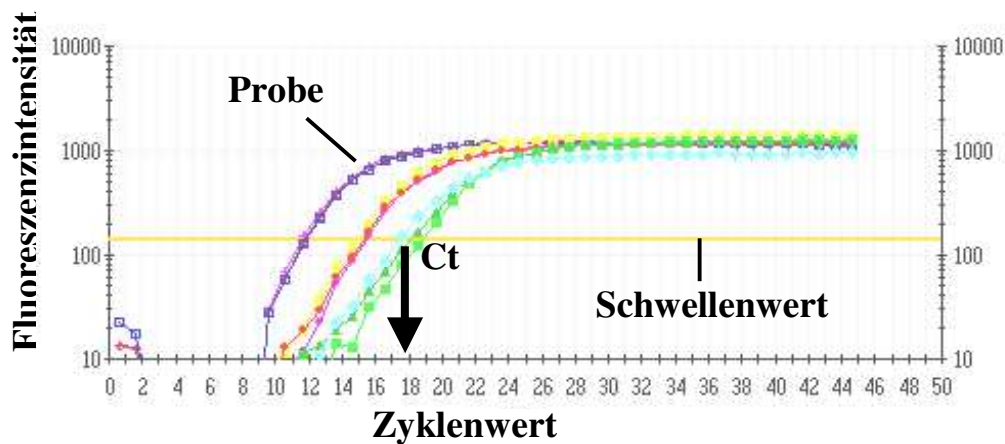
Im Anschluss an den letzten PCR-Schritt folgte zur Charakterisierung des PCR-Endprodukte die Aufnahme einer sogenannten „Schmelzkurve“ (Abbildung 14). Diese dient dazu, zu überprüfen ob neben dem gesuchten PCR-Produkt noch weitere Nebenprodukte entstanden sind, die möglicherweise zu einer Kompetition bei der Echt-Zeit-Messung geführt haben könnte. Die doppelsträngigen PCR-Produkte wurden dazu durch Erhöhung der Temperatur von 50°C auf 100°C in 0,5°C Schritten in Einzelstränge „aufgeschmolzen“. Der Übergang von doppelsträngiger zu einzelsträngiger DNA ist ein hochkooperativer Prozess, d.h. er findet innerhalb geringer Temperaturbereiche statt. Die Interkalation von SYBR-GREEN ist in einzelsträngiger DNA höher im Vergleich zu doppelsträngiger DNA. Das bedeutet, dass durch das Aufschmelzen die Fluoreszenz stark ansteigt. Entstand bei der PCR nur ein Hauptprodukt, war auch nur eine charakteristische Aufschmelztemperatur detektierbar.



**Abbildung 14: Typische Schmelzkurve eines sauberen PCR-Amplifikats.** Gezeigt ist die erste Ableitung der Fluoreszenz in Abhängigkeit der Zeit.

### 2.9.8 Auswertung der Echt-Zeit-PCR

Am Ende der PCR-Reaktion ließ sich aus den aufgenommenen Gesamtkurve die sogenannte exponentielle Phase bestimmen, die Phase, in der die Fluoreszenz durch interkalierenden Farbstoff stark ansteigt. In den Beginn dieser sogenannten exponentiellen Phase wurde manuell ein Schwellenwert angelegt, so dass jeder PCR-Messkurve eindeutig ein PCR-Zyklus-Wert zugeordnet werden konnte, bei der das Fluoreszenz-Signal den sogenannten Schwellenwert durchbrach und das Rauschen eindeutig übertraf ( $C_t$ -Wert). Abbildung 15 zeigt eine halblogarithmische Auftragung des Fluoreszenzsignals über der Zyklenzahl.



**Abbildung 15: Halblogarithmische Auftragung des Fluoreszenzsignals über dem Zykluswert mit einem manuell gesetzten Schwellenwert.**

Als Quantifizierungsmethode wurde die sogenannte  $\Delta\Delta C_t$ -Methode gewählt, bei der die Menge eines spezifischen Transkripts (S) in zwei Proben relativ zueinander unter Verwendung der folgenden Formeln bestimmt wurde.

Zunächst wird dazu die Differenz der  $C_t$ -Werte ( $\Delta C_t$ ) von (S) und GAPDH (H) für nicht stimulierter Proben ( $\Delta C_{tu}$ ) und stimulierten Probe ( $\Delta C_{ts}$ ) gebildet:

$$1.) \Delta C_{tu} = C_t(S) - C_t(H)$$

$$2.) \Delta C_{ts} = C_t(S) - C_t(H)$$

Weiterhin wird die Differenz dieser  $\Delta C_t$ -Werte gebildet ( $\Delta \Delta C_t$ ):

$$\Delta \Delta C_t = \Delta C_{tu} - \Delta C_{ts}$$

$\Delta C_{tu}$  entspricht dabei der Differenz in  $c_t$  für spezifisches Gen zu Housekeeping-Gen für die nicht stimulierte Probe.  $\Delta C_{ts}$  ist die entsprechende Differenz für die stimulierte Probe

Die Expression des spezifischen Transkripts S in der unbehandelten Probe relativ zur stimulierten Probe ergibt sich als:

$$\text{Relative Expression} = 2^{-\Delta \Delta C_t} \times 100 [\%]$$

Diese Gleichung und damit diese Quantifizierungsmethode kann strenggenommen jedoch nur angewandt werden, wenn die Effizienzen der PCR-Reaktionen von S und GAPDH identisch sind.

### **2.9.9 cRNA-Synthese, DNA-Microchip-Hybridisierung und Datenanalyse**

DNA-Microarrays haben in der Forschung in den letzten Jahren eine große Bedeutung erlangt. Das Haupteinsatzgebiet ist derzeit die Analyse der Genexpression (BLOHM & GUISEPPI-ELIE, 2001). Das große Potential der Methode liegt in der hohen Parallelität, die es gestattet, Hunderte oder Tausende von Genen gleichzeitig zu erfassen.

In der vorliegenden Arbeit wurde das „Gene Chip Instrument System“ der Firma Affymetrix und eine speziell auf Rattengen ausgerichtete Chipserie (*RG\_U34A*) für die Hybridisierung von ca. 24000 Genen und ESTs verwendet. EST steht dabei für „*Expressed Sequence Tags*“, die Gensequenzen mit bekannter Sequenz aber fehlender Zuordnung zu einem Gen oder Protein darstellen (SCHULER, 1997).

Für die DNA-Microchip-Hybridisierung war eine stark aufgereinigte RNA erforderlich. Dazu wurde das durch die Trizol-Methode (2.10.2) gewonnene RNA-Pellet, in diesem speziellen

Fall aus 4 vereinigten Falcon-T-75-Flaschen (Kultivierungsfläche von 75cm<sup>2</sup>) pro Bedingung, zunächst mit dem Stratagene<sup>®</sup> *Absolutely* RNA<sup>™</sup>Micropep Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Qualität der RNA wurde auf einem denaturierendem Agarosegel (2.11.1) überprüft. Für die DNA-Microchip-Hybridisierung wurde die aufgereinigte RNA auf eine Konzentration von 1µg/µl eingestellt und im Labor von Dr. Ivashchenko (Aventis Pharma Deutschland GmbH, Herz-Kreislauf-Forschung) zur cRNA-Synthese und anschließender DNA-Microchip-Hybridisierung nach dem „*standard-one-round amplification protocol*“ weiter verwendet.

Zur cDNA-Synthese wurden 5µl (5µg) der speziell aufgereinigten RNA mit 2µl 100pmol T7 oligo d(T)<sub>24</sub> Primer [5'GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCA-CTATAGGGAGGCGG-(dT<sub>24</sub>)-3'] gemischt. Mögliche RNA-Sekundärstrukturen und RNA-Doppelstränge wurden durch 10-minütige Erwärmung auf 72°C aufgeschmolzen. Durch schnelles Abkühlen, die Proben wurden dazu sofort auf Eis gestellt, konnte eine Rückfalten der Einzelstränge verhindert werden. Anschließend wurden 4µl 5x Erststrang-Synthesepuffer, 2µl 0,1M DTT und 1µl 10mM dNTPs zugegeben und der Ansatz 2min bei 42°C zum Anlagern der Primer präinkubiert. Durch Zugabe von 1µl der reversen Transkriptase Superscript II (200U) (Life Technologies) wurde die Reaktion gestartet und der Reaktionsansatz für 1h bei 42°C inkubiert.

Für die Zweitstrangsynthese wurden 30µl 5x Zweitstrang-Synthesepuffer, 91µl RNase-freies Wasser, 3µl 10mM dNTPs, 4µl *E. coli* DNA Polymerase I (40U), 1µl *E. coli* DNA-Ligase (10U) und 1µl RNase H (2U) zugegeben und dieser Ansatz 2h bei 16°C inkubiert. Nach Zugabe von 2µl T4polymerase I (Fa. TaKaRa) wurde für weitere 5min inkubiert. Die Reaktion wurde durch das Zufügen von 10µl 0,5M EDTA gestoppt und die doppelsträngige cDNA durch den *GeneChip Sample Cleanup Kit* nach Herstellerangaben aufgereinigt. Nach Reinigung lag die cDNA in 23µl wässriger Lösung vor.

21µl doppelsträngige cDNA wurden für die Synthese von biotinylierter *antisense*-RNA mit Hilfe des *BioArray High Yield RNA Transcript Labeling Kit* (Fa. Enzo Diagnostics) nach Herstellerangaben verwendet. Die biotinylierte cRNA wurde anschließend erneut mit dem *GeneChip Sample Cleanup Kit* aufgereinigt. Die Qualitäts- und Quantitätsbestimmung der RNA erfolgte mittels dem *RNA Nano Lab Chip* der Firma Agilent im dazugehörigen Bioanalyzer. Fragmentierung, Hybridisierung mit *RG\_U34A* (Fa. Affymetrix), Waschschrte, Färbung und einlesen mit dem Gene Array Scanner (Fa. Affymetrix) wurde nach dem Standard-Protokoll von Affymetrix (*Gene Expression Technical Manual*) durchgeführt.

Zur Rohdaten-Analyse und zur Erstellung der Vergleichsdaten wurde die Affymetrix GenChip Analysis Suite 4.0 Software verwendet. Die Ergebnisse der mit Affymetrix Genechip erhobenen Daten wurden mit den Programmen „*Resolver 4.1*“ (Rosetta Biosoftware, USA) und Microsoft Access ausgewertet.

## **2.10 Allgemeine molekularbiologische Methoden**

Zur finalen Validierung einer PCR und zur Spezifizierung der Primerpaare, wurde diese wie unter 2.10.6 beschrieben durchgeführt und das finale PCR-Produkt sequenziert. Dazu wurde die PCR-Fragmente mittels eines denaturierenden Agarosegels aufgetrennt, das gewünschte DNA-Fragment aus dem Gel extrahiert und in einen sogenannten Sequenzierungsvektor (TOPO-TA-Vektor) ligiert. Nach einem analytischen Verdau erfolgte die Sequenzierung. In diesem Abschnitt werden kurz die dazu benötigten allgemeinen Methoden vorgestellt.

### **2.10.1 Agarose-Gelelektrophorese**

DNA-Moleküle, wie die PCR-Amplifikate oder geschnittene DNA lassen sich in einem Agarosegel elektrophoretisch nach Größe auftrennen. Diese Methode wurde standardmäßig zur Identifizierung (analytisch) oder zur präparativen Isolierung linearer DNA-Fragmente verwendet (SAMBROCK ET AL., 1989).

Zur Herstellung eines 1-2%igen analytischen Agarosegels wurde die entsprechende Agarosemenge in 1xTAE-Puffer in der Siedehitze gelöst und bei ca. 50°C mit 0,5µg/ml EtBr (Ethidiumbromid) versetzt. Die Lösung wurde in einen Gelschlitten gegossen, in dem ein Probenkamm eingesetzt wurde. Nach dem Polymerisieren des Gels wurde der Kamm entfernt, das Gel in die horizontale Elektrophoresapparatur eingesetzt und mit 1xTAE-Puffer übergossen. Nach Beladen der Probenfächer mit den DNA-Proben in 1xProbenpuffer wurde die Elektrophorese bei einer Spannung von 135V durchgeführt. Die DNA-Banden konnten durch UV-Licht (Herolab 2020) der Wellenlänge 302nm durch die Fluoreszenz von an DNA gebundenen EtBr visualisiert und mit einem Skalpell ausgeschnitten werden.

### **2.10.2 Gelextraktion und Klonierung in einen Sequenzierungsvektor**

Die Isolierung des gewünschten DNA-Fragments aus der DNA-Bande eines Agarosegels erfolgte mittels des *QIAquick™Gel Extraktion-Kits* (Qiagen) nach Herstellerangaben. Die



Ligation des eluierten PCR-Amplifikats erfolgte mittels dem *TOPO-TA Cloning*<sup>®</sup> Kit (Invitrogen) ebenfalls nach Angaben des Herstellers.

### **2.10.3 DNA-Restriktion**

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mittels dem *QiaPrep*<sup>®</sup> *Spin Miniprep Kit* der Firma Qiagen nach Herstellerangaben. Die Gewinnung der Plasmid-DNA basiert auf einer alkalischen Lyse der Bakterien und einer darauffolgenden Adsorption der DNA an eine Silikamatrix in Gegenwart einer hohen Salzkonzentration.

### **2.10.4 Photometrische Analyse der DNA**

Zur Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der eluierten DNA, wurde die Absorption einer geeigneten Verdünnung bei 260 und 280nm mit einem Absorptionsphotometer (Genequant, Pharmacia Biotech) gemessen. Unter Anwendung des Lambert-Beerschen-Gesetzes ließ sich die Konzentration aus der Absorption und dem bekannten Extinktionskoeffizienten berechnen, wobei eine optische Dichte von 1 einer ungefähren Konzentration von 50µg/ml doppelsträngiger DNA entsprach. Zur Abschätzung der Reinheit der DNA-Lösung wurde der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  herangezogen. Er sollte zwischen 1,6 und 2,0 liegen.

### **2.10.5 Sequenzanalyse von DNA**

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach einer modifizierten Kettenabbruchmethode, wie bereits bei SANGER ET AL. (1977) beschrieben, mit einem dafür geeigneten Sequenzer (ABI Prism 310 Genetic Analyser, Fa. ABI, Applied Biosystems) unter Verwendung des *ABI-BigDye-Terminator-Ready-Reaction-Kit* (Perkin Elmer) nach Herstellerangaben. Diese Analyse wurde in einer Biotechnologieabteilung der Aventis Pharma GmbH (Frau Metz-Weidmann; *Functional Genomics*) durchgeführt.

## **2.11 Auswertung, Statistik und graphische Bildbearbeitung**

Versuche wurden, wenn nicht anders angegeben, in drei- bis achtfacher Bestimmung durchgeführt. Die Bestimmung von Mittelwerten, Standardabweichung (SD), Standardfehler

des Mittelwertes (S.E.M.; für *Standard Error of the Mean*) erfolgte mit Hilfe der Microsoft-Excel-2000-Software.

Zur Signifikanzprüfung wurde der ungepaarte Student t-Test der SigmaSTAT-2.03-Software verwendet. Hierbei symbolisiert in den Abbildungen ein \* =  $p < 0,05$ .

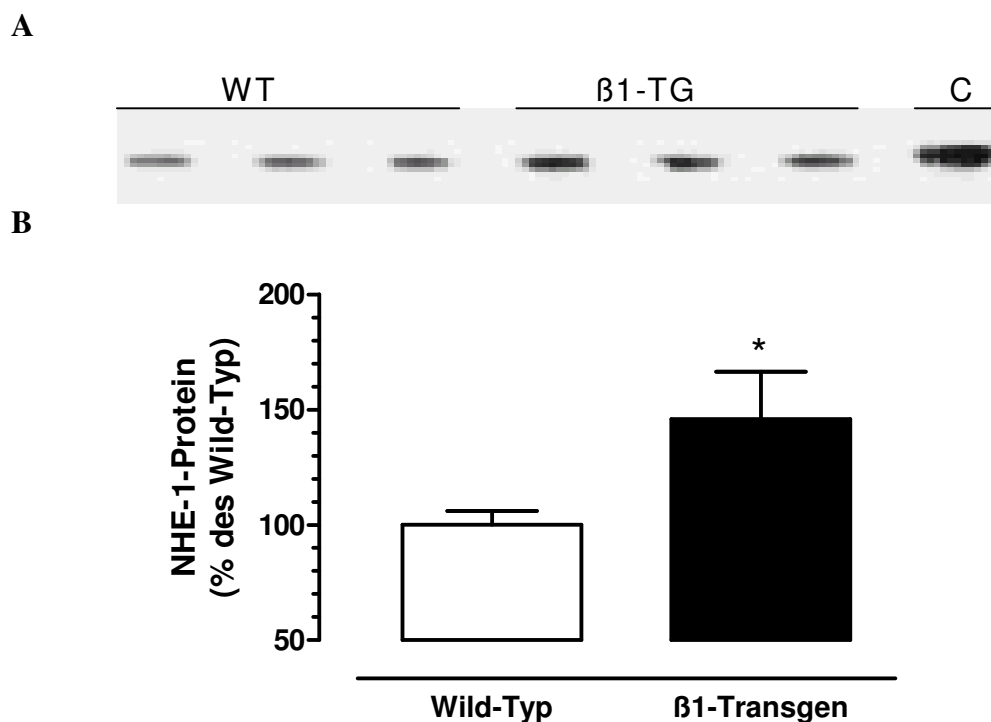
Alle Diagramme und Graphen wurden mit Hilfe des Programms Graph-Pad-Prism-3.0-Software erstellt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Überexpression des NHE-1-Proteins in $\beta_1$ -transgenen Mäusen

In einer  $\beta_1$ -transgenen Maus wird durch die Überexpression des kardialen  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors eine Herzhypertrophie erzeugt. Von der Arbeitsgruppe um Prof. Lohse (Julius-Maximilians-Universität Würzburg) konnte gezeigt werden, dass diese Hypertrophie durch die chronische Behandlung mit dem NHE-1-Inhibitor Cariporide verhindert wird (ENGELHARDT ET AL., 2002).

Die Untersuchung der kardialen Expression des NHE-1 in 5 Monate alten  $\beta_1$ -transgenen Mäusen unterstützte die Bedeutung des NHE-1 für die Entstehung der Herzhypertrophie. Mittels Western Blot konnte im Herzgewebe  $\beta_1$ -transgener Mäuse eine signifikante Erhöhung des NHE-1-Proteingehalts um 46% im Vergleich zu Wild-Typ-Mäusen nachgewiesen werden (Abbildung 16 A und B).



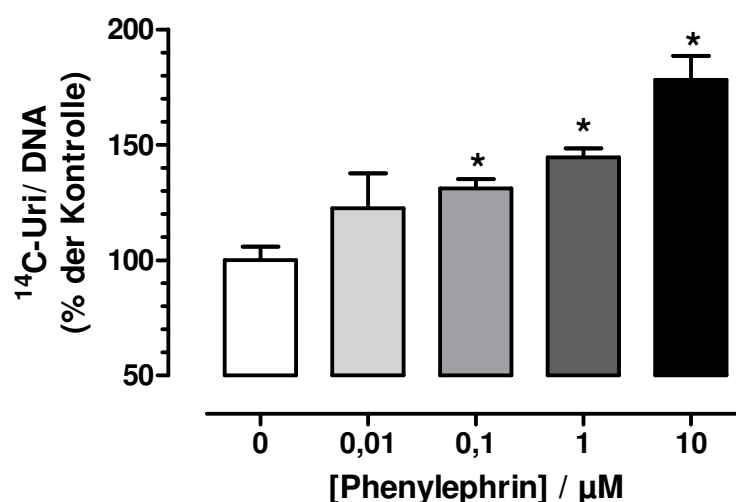
**Abbildung 16: Kardiale NHE-1 Expression in  $\beta_1$ -transgenen Mäusen:** (A) Dargestellt ist ein charakteristischer Western Blot. Aufgetragen sind Herzgewebe vom Wild-Typ (WT),  $\beta_1$ -transgene Tier ( $\beta_1$ -TG) und die Positivkontrolle aus „mouse fibroblast L cell line“ (LAP1) Fibroblasten-Zellen, die das humane NHE-1 überexprimieren (LAP-1 hNHE-1) (C). (B) Auswertung. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis mit  $n = 3$  Herzgeweben pro Bedingung. Aufgetragen sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* =  $p < 0,05$  vs. Wild-Typ Mäuse.

### **3.2 Validierung der $\alpha_1$ -adrenerg vermittelten Hypertrophie-Induktion im in vitro Modell isolierter Kardiomyozyten**

#### **3.2.1 $\alpha_1$ -adrenerg induzierte RNA-Neusynthese und Proteinbiosynthese**

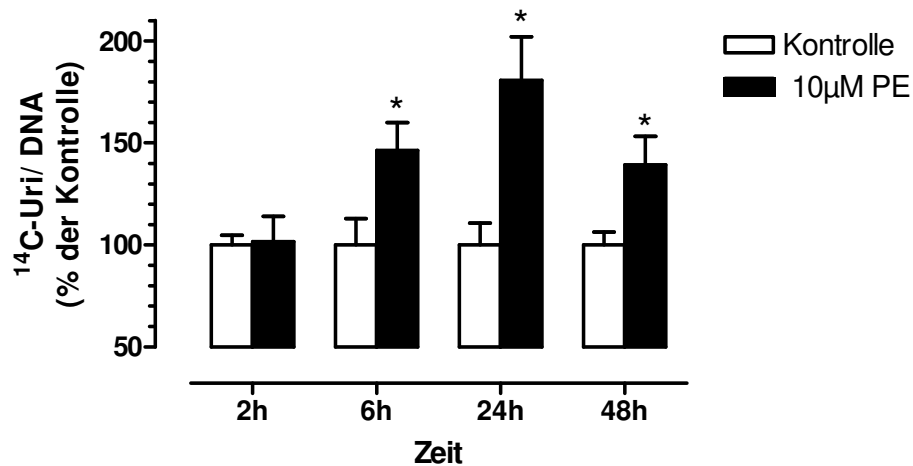
Ein zelluläres Modell für die Erfassung der Herzhypertrophie sind Untersuchungen an isolierten Kardiomyozyten. Die Myozytenhypertrophie kann dabei anhand der Zunahme der RNA- und Protein-Neusynthese einer Kardiomyozyte gemessen werden.

Um den Einfluss der  $\alpha_1$ -adrenerg vermittelte Steigerung der RNA-Neusynthese zu untersuchen, wurden Kardiomyozyten zunächst mit [ $^{14}$ C]-Uridin-haltigem ( $^{14}$ C-Uri, 0,1  $\mu$ Ci/ml) CCT-Joklik-Medium für 6 bis 48 Stunden in Anwesenheit verschiedener Phenylephrin-Konzentrationen inkubiert. Aus Abbildung 17 lässt sich entnehmen, dass, verglichen zu unbehandelten Kulturen, die Inkubation mit 10  $\mu$ M Phenylephrin (PE, 10  $\mu$ M) zu einer signifikanten Erhöhung der RNA-Neusynthese führte.



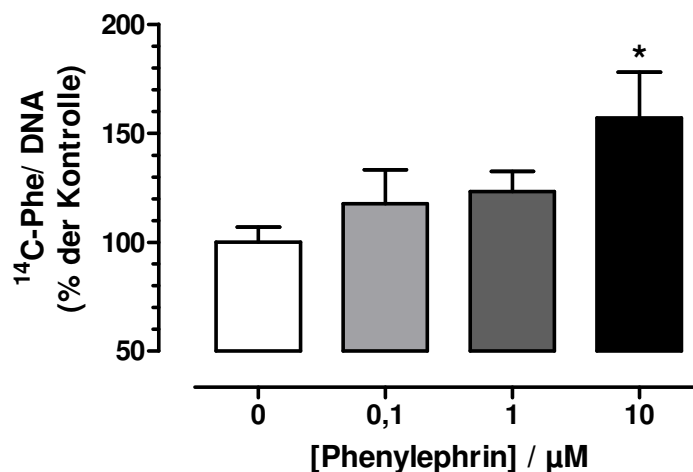
**Abbildung 17: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der gesteigerten RNA-Neusyntheserate nach 24-stündiger Inkubation in Abhängigkeit von der eingesetzten Phenylephrinkonzentration.** Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM eines repräsentativen Experiments mit  $n \geq 6$  Kulturschalen pro Bedingung. \* =  $p < 0,05$  vs. unstimulierten Kulturen.

Die Zeitabhängigkeit der Phenylephrin-induzierten RNA-Neusynthese ist in Abbildung 18 dargestellt. Daraus folgt, dass der optimale Inkubationszeitraum für die Behandlung mit 10  $\mu$ M Phenylephrin (PE) eine 24-stündige Stimulationsphase ist, der den Daten von PINSON ET AL. (1993) entspricht. Aufgrund des transienten Musters der  $\alpha_1$ -adrenergen RNA-Neusyntheseaktivierung wurden alle nachfolgende Experimente mit einer Stimulationsphase von 24 Stunden durchgeführt.



**Abbildung 18: Zeitverlauf der Aktivierung der RNA-Neusynthese nach  $\alpha_1$ -adrenergen Stimulus (10  $\mu$ M Phenylephrin, PE).** Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM eines repräsentativen Experiments mit  $n \geq 6$  Kulturschalen pro Bedingung. \* =  $p < 0,05$  vs. mitlaufende Kontrolle des jeweiligen Zeitraumes.

Ein weiterer Parameter der Hypertrophie stellt die Protein-Neusynthese der Kardiomyozyten dar. Um den Einfluss der  $\alpha_1$ -adrenerg vermittelten Steigerung der Proteinsynthese beurteilen zu können, wurden Kardiomyozyten mit [ $^{14}$ C]-Phenylalanin-haltigem CCT-Joklik-Medium für 24 Stunden in Gegenwart von 4 verschiedenen Konzentrationen Phenylephrin inkubiert. Die höchste der eingesetzten Phenylephrin-Konzentrationen steigerte die Proteinsyntheserate signifikant, verglichen zu unstimulierten Kardiomyozyten (Abbildung 19).

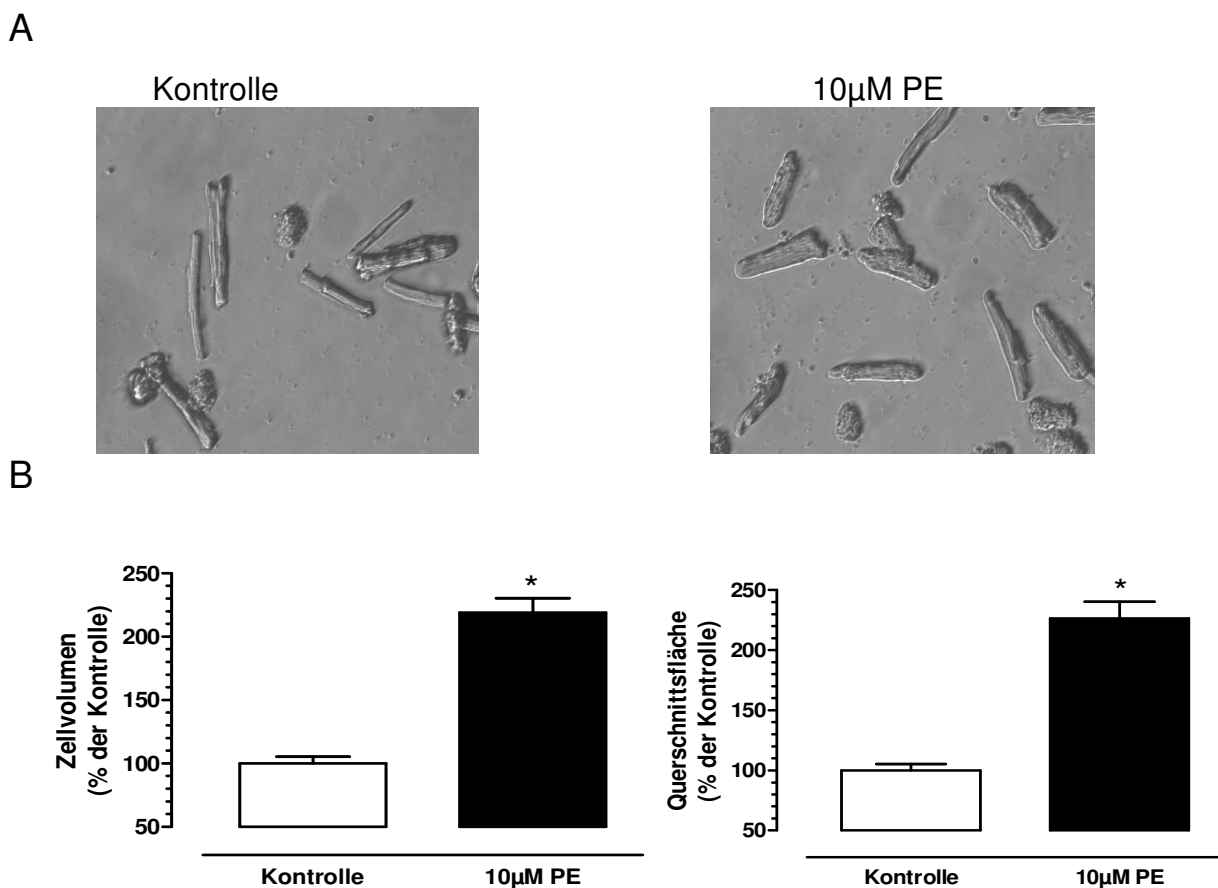


**Abbildung 19: Konzentrations-Wirkungsbeziehung der Phenylephrin induzierten Proteinbiosynthese.** Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM eines repräsentativen Experiments mit  $n \geq 6$  Kulturschalen pro Bedingung. \* =  $p < 0,05$  vs. Kontrolle.

### 3.2.2 $\alpha_1$ -adrenerg vermittelte Zunahme von Zellvolumen und Zellquerschnittsfläche

Die Myozytenhypertrophie kann zusätzlich anhand der Zunahme des Volumens und der Querschnittsfläche einer Kardiomyozyte gemessen werden. Um den Einfluss eines  $\alpha_1$ -adrenergen Stimulus (Phenylephrin, 10 $\mu$ M) auf das Volumen und die Querschnittsfläche einer Kardiomyozyte bestimmen zu können, wurden Kardiomyozyten für 24h mit Phenylephrin (PE, 10 $\mu$ M) inkubiert.

Anschließend wurden die morphologischen Veränderungen sowie das Volumen und die Querschnittsfläche der Zellen wie im Methodenteil (Kapitel 2.6.2) ausführlich beschrieben, ausgewertet. In Abbildung 20A sind repräsentative Photoaufnahmen von Kardiomyozyten-Kulturen unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen abgebildet



**Abbildung 20: Phenylephrin induzierte Zunahme des Zellvolumens und Querschnittsfläche:** (A) Myozytenmorphologie nach 24-stündiger Stimulation (80fache Vergrößerung); (B) Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 Experimenten mit 90-170 Zellen pro Bedingung. Zellen aus unbestimulierter Kultur und nach Phenylephrin-Stimulation (PE 10 $\mu$ M), wurden analysiert. \* =  $p < 0,05$  vs. unstimulierte Kulturen.

Die mit Phenylephrin-behandelten Zellen nahmen nach 24-stündiger Stimulation eindeutig im Volumen zu. Phenylephrin steigerte sowohl das Zellvolumen 2,2fach als auch die

Querschnittsfläche der Zellen um bis zu 2,3fach signifikant gegenüber den Kontrollzellen (Abbildung 20B). Ein über einen initialen Schwund hinausgehendes Absterben der Zellen konnte in diesen Experimenten nicht beobachtet werden. Das galt sowohl für die stimulierten als auch unstimulierten Zellen.

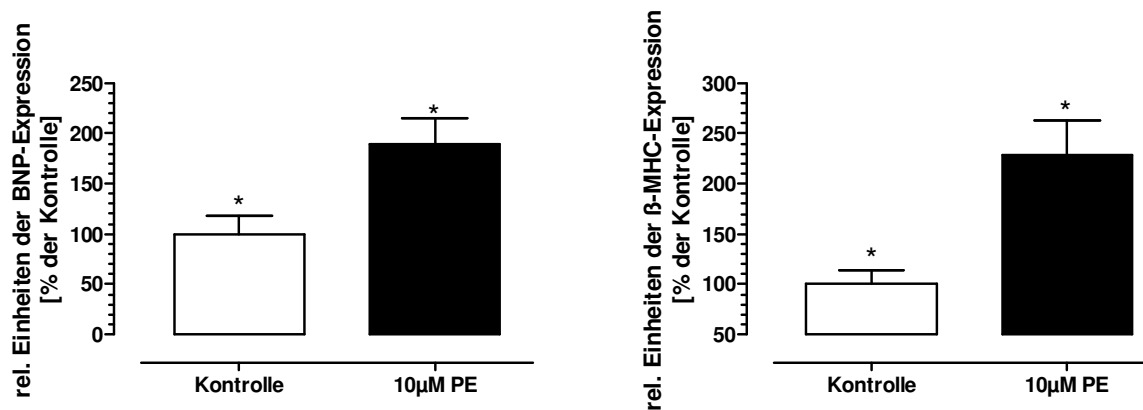
### **3.2.3 Genetische Marker myokardialer Hypertrophie**

In der Literatur existieren für neonatale Rattenkardiomyozyten Daten bezüglich Markergene der Hypertrophie. So gibt es beispielsweise bereits Informationen über Genexpressionssteigerungen der schweren Kette des Myosin (im englischen *β-myosin heavy chain*; β-MHC) (SCHAUB ET AL., 1997, PATTEN ET AL., 1996). Ein Wechsel der schweren Kette des Myosins von der α- auf die β-Isoform ist kennzeichnend für eine myokardiale Hypertrophie in den neonatalen Kardiomyozyten. Von den natriuretischen Peptiden (wie z.B. BNP) ist bekannt, dass sie vor allem in der fötalen und frühen neonatalen Entwicklung von ventrikulären Kardiomyozyten exprimiert werden und dass sie während der Entwicklung einer Hypertrophie und einem Fortschreiten dieser Entwicklung zur Herzinsuffizienz erneut stark induziert werden (OMURA ET AL., 2002).

Zum Nachweis der Hypertrophie auf transkriptioneller Ebene in adulten Rattenkardiomyozyten wurden daher β-MHC und BNP als typische Marker myokardialer Hypertrophie ausgewählt und die Expression mittels Echt-Zeit-PCR in adulten Kardiomyozyten untersucht. In der Literatur sind derzeit keine geeigneten Ratten-Primer beschrieben. Aus den gefundenen Sequenzen für andere Spezies wurden daher Primer abgeleitet und diese auf ihre Eignung in der Echt-Zeit-PCR getestet. Nachdem die Annealing-Temperatur und Zyklenzahl bestimmt, sowie die Magnesium-Konzentration des Reaktionspuffers austitriert worden war, wurde zur Bestimmung der Nukleinsäuresequenz die eluierte DNA der jeweiligen PCR-Amplifikate zur Sequenzanalyse an das Labor von Frau Metz-Weidmann (Aventis Pharma; *Functional Genomics*) geschickt. Beide PCR-Produkte der Primerkombinationen für BNP und β-MHC wiesen eine 100%ige Homologie zu den jeweiligen Sequenzen auf.

Im Folgenden wurden adulte Rattenkardiomyozyten für 24 Stunden mit Phenylephrin (PE, 10μM) inkubiert.

Sowohl die RNA von BNP als auch  $\beta$ -MHC wurden in den Zellen durch die  $\alpha_1$ -adrenerge Stimulation mittels Phenylephrin signifikant verstärkt exprimiert (Abbildung 21).



**Abbildung 21: Nachweis der BNP- und  $\beta$ -MHC-Expression nach 24-stündiger Phenylephrin (PE, 10µM)-Stimulation in adulten Rattenkardiomyozyten.** Linkes Bild: BNP; rechtes Bild:  $\beta$ -MHC. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 4 unabhängigen Experimenten mit Triplikaten pro Bedingung in den jeweiligen Experimenten. \* =  $p < 0,05$  vs. Kontrollzellen.

Adulte Rattenkardiomyozyten eignen sich den ersten Ergebnissen nach sehr gut zur Untersuchung der myokardialen Hypertrophie. Gegenüber den Daten, die aus Messungen der Proteinbiosynthese gewonnen wurden, zeigten die Ergebnisse der RNA-Synthese-Messung einen deutlich stärkeren Effekt des hypertrophen Stimulus Phenylephrin, so dass im Folgenden in der Regel nahezu ausschließlich Daten zur gesteigerten RNA-Neusynthese adulter Kardiomyozyten aufgeführt werden.

### **3.3 Hemmung der $\alpha_1$ -adrenerg vermittelten Hypertrophie-Induktion in isolierten Kardiomyozyten durch spezifische NHE-1-Inhibitoren**

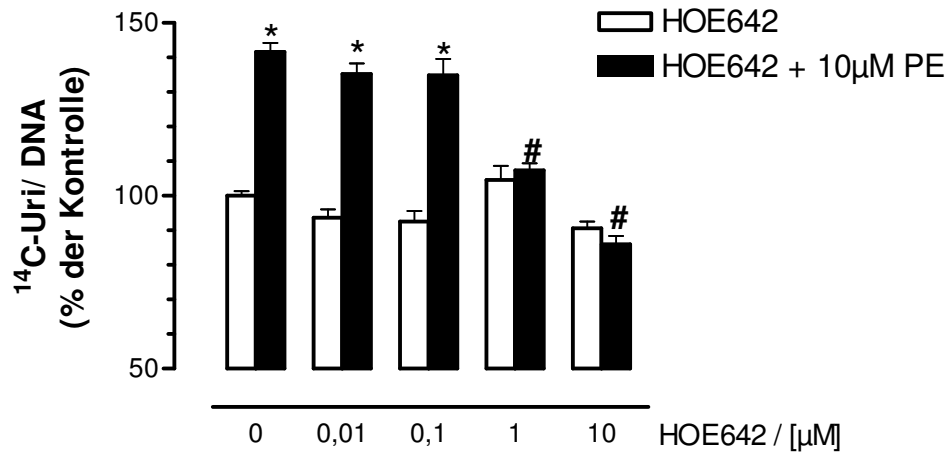
#### **3.3.1 Wirkung von Cariporide**

Um den Einfluss von Cariporide (HOE642) auf die myokardiale Hypertrophie bestimmen zu können, wurden Kardiomyozyten nach 15-minütiger Vorbehandlung mit dem NHE-1-Inhibitor Cariporide (10µM) für 24h mit dem  $\alpha_1$ -adrenergen Stimulus Phenylephrin (PE, 10µM) in dem jeweiligen radioaktiven CCT-Joklikmedium versetzt.

Cariporide reduzierte die Phenylephrin-vermittelte Steigerung der RNA-Neusynthese konzentrationsabhängig (Abbildung 22). In der höchsten untersuchten Konzentration (10µM) reduzierte Cariporide die  $\alpha_1$ -adrenerg vermittelte Zunahme der RNA-Neusynthese signifikant

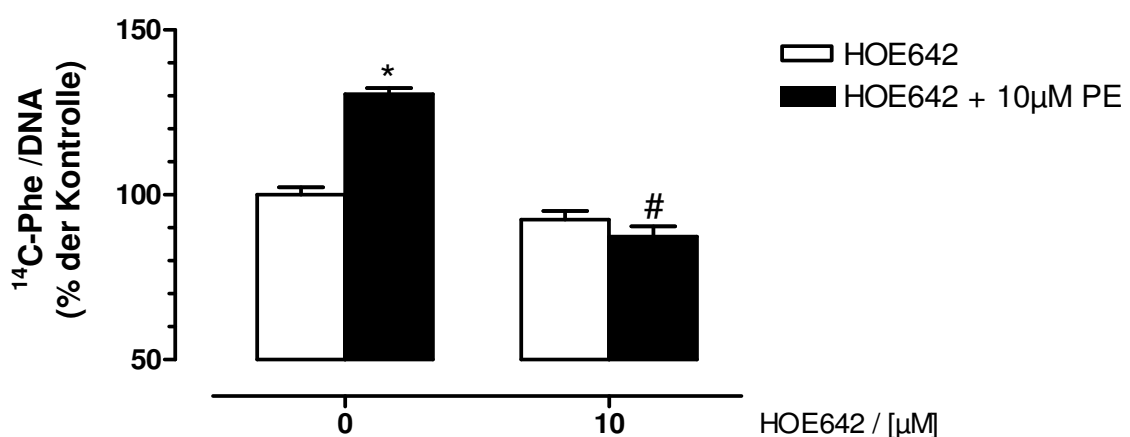


bis auf Kontrollniveau. Cariporide hatte in allen getesteten Konzentrationen keinen signifikanten Einfluss auf die basale RNA-Syntheserate im Vergleich zu unstimulierten Kulturen.



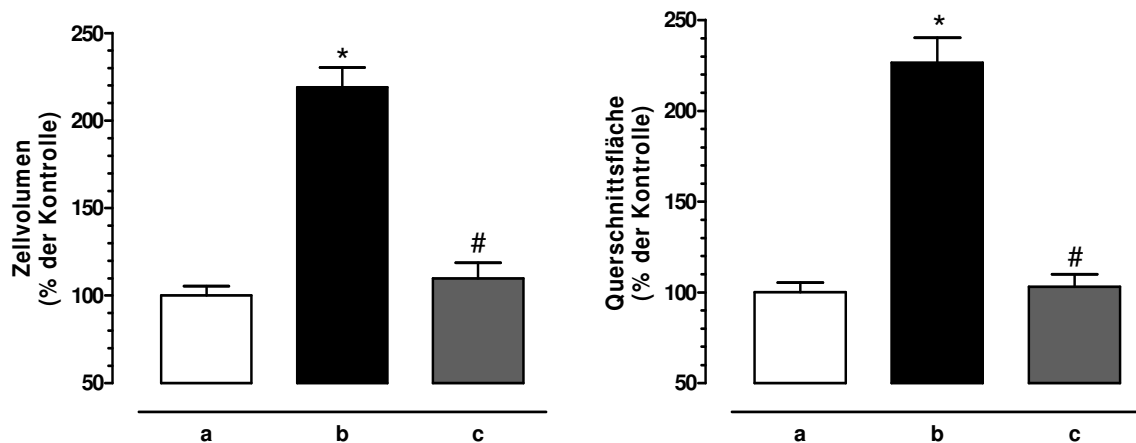
**Abbildung 22: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der mittels Phenylephrin (PE, 10µM) gesteigerten RNA-Neusynthese in Abhängigkeit von der eingesetzten Cariporide-(10µM) Konzentration** (gemessen anhand der [ $^{14}\text{C}$ ]-Uridin-Inkorporation). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM eines repräsentativen Experiments mit  $n \geq 6$  Kulturschalen pro Bedingung. \* =  $p < 0,05$ ; # =  $p < 0,05$  vs. Phenylephrin ohne Cariporide.

Zur Inhibition der  $\alpha_1$ -adrenerg vermittelten Steigerung der Proteinsynthese wurden ebenfalls verschiedene Konzentrationen von Cariporide getestet. Cariporide verminderte in einer Konzentration von 10µM die  $\alpha_1$ -adrenerg vermittelte Zunahme der Proteinsynthese signifikant auf annähernd Kontrollniveau ohne dabei alleine auch Einfluss auf die basale Proteinsynthese zu haben (Abbildung 23).



**Abbildung 23: Einfluss der NHE-1-Hemmung auf die Proteinbiosynthese nach Phenylephrin-Stimulation (PE, 10µM).** Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM eines repräsentativen Experiments mit  $n \geq 6$  Kulturschalen pro Bedingung. \* =  $p < 0,05$  vs. Kontrolle; # =  $p < 0,05$  vs. PE.

Cariporide inhibiert in der eingesetzten Konzentration von 10 $\mu$ M ebenfalls die  $\alpha_1$ -adrenerg vermittelte Zunahme des Zellvolumens und der Querschnittsfläche der einzeln untersuchten Kardiomyozyten (Abbildung 24).



**Abbildung 24: Einfluss der NHE-1-Hemmung auf die Zunahme des Zellvolumens und Querschnittsfläche nach Phenylephrin-Stimulation;** Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 Experimenten mit 90-170 Zellen pro Bedingung. Zellen aus unstimulierter Kultur (a), nach Phenylephrin-Stimulation (PE 10 $\mu$ M; b), sowie mit Phenylephrin-Stimulation nach 15-minütiger Vorinkubation mit Cariporide (10 $\mu$ M; c) wurden analysiert. \* =  $p < 0,05$  vs. unstimulierte Kulturen; # =  $p < 0,05$  vs. PE

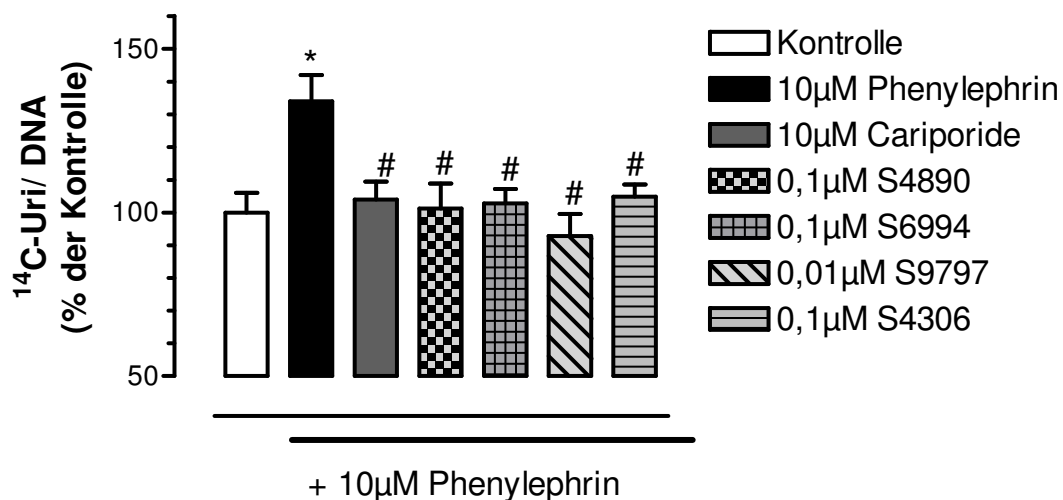
Die mit Phenylephrin-behandelten Zellen zeigten nach 24-stündiger Stimulation eine erhebliche Volumenzunahme. Phenylephrin steigerte sowohl das Zellvolumen ca. 2,2fach als auch die Querschnittsfläche der Zellen um bis zu 2,5fach signifikant gegenüber den Kontrollzellen. Die Vorinkubation mit Cariporide verminderte die Zunahme sowohl des Zellvolumens als auch der Querschnittsfläche signifikant gegenüber den ausschließlich mit Phenylephrin-behandelten Zellen. Bei den Cariporide-vorbehandelten Zellen konnten annähernd die Größenordnungen der Kontrollzellen wiederhergestellt werden.

### 3.3.2 Klasseneffekt von NHE-1-Inhibitoren

Um zu überprüfen, ob die Hypertrophie-inhibierenden Effekte des NHE-1-Inhibitors Cariporide Substanz- oder Zielgen-spezifisch waren, wurden weitere strukturell unterschiedliche NHE-1-Inhibitoren getestet. Die in dieser Arbeit getesteten NHE-1-Inhibitoren stellen, bis auf die Substanz S9797, Benzoylguanidine mit unterschiedlichen Grundgerüsten dar (Siehe auch Anhang A). Zunächst wurden auch für die übrigen NHE-1-Inhibitoren, die bis auf die Substanz S9797 aus dem derzeitigen Programm der NHE-1-

Forschung von AVENTIS Pharma entnommen wurden, Konzentrations-Wirkungs-Kurven erstellt. Aus LAP-1 hNHE-1-Zellen, einer den humanen NHE-1 überexprimierenden Mausfibroblasten-Zelllinie, lagen Angaben zum  $IC_{50}$ -Wert des jeweiligen NHE-1-Inhibitors vor. Diese  $IC_{50}$ -Werte dienten als Richtwert für die Konzentrationsauswahl. Generell wurde mit einer Konzentration begonnen, die 10-fach höher in den Experimenten als der bereits bekannte  $IC_{50}$ -Wert für eine NHE-1-Inhibition lag.

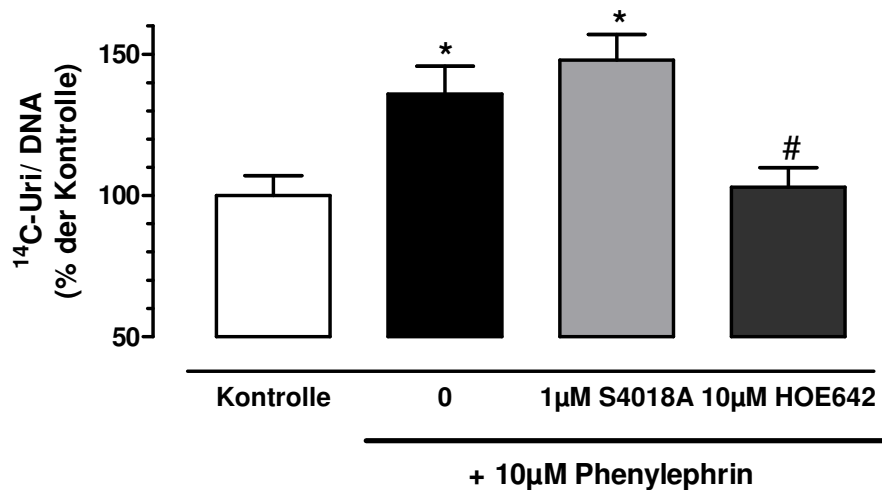
In Abbildung 25 sind die wirksamsten Konzentrationen aller in der vorliegenden Arbeit getesteten NHE-1-Inhibitoren aufgeführt.



**Abbildung 25: Einfluss verschiedener strukturell unterschiedlicher NHE-1-Inhibitoren auf die  $\alpha_1$ -adrenerg induzierte RNA-Neusynthese.** Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM eines repräsentativen Experiments mit  $n = 8$  Kulturschalen pro Bedingung. \* =  $p < 0,05$  vs. Kontrolle; # =  $p < 0,05$  vs. PE.

Die Phenylephrin-induzierte RNA-Syntheserate wurde von 10µM Cariporide (HOE642), 0,1µM S4890, 0,1µM S6994, 0,01µM S9797 und von 0,1µM S4306 signifikant Kontrollniveau reduziert. Die hier verwendeten Inhibitoren hatten alleine keinen Effekt auf die basale RNA-Syntheserate der Kardiomyozyten (Daten sind hier nicht gezeigt).

Um dieses Ergebnis zu vervollständigen, wurde mit S4018A eine weitere Substanz, die zwar strukturverwandt zu Cariporide ist, nicht aber NHE-1, sondern den ubiquitären exprimierten NHE-3 mit einem  $IC_{50}$  von 0,018µM hemmt (BRANT ET AL., 1995), getestet. Bei einer Konzentration von 1µM hatte S4018A keinen Einfluss auf den untersuchten Parameter der RNA-Neusynthese in Kardiomyozyten (Abbildung 26).



**Abbildung 26:** Einfluss des NHE-3-Inhibitors S4018A (1µM) auf die nach  $\alpha_1$ -Adrenozeptor-Stimulation induzierte, signifikante Steigerung der RNA-Syntheserate. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM eines repräsentativen Experiments mit  $n = 8$  Kulturschalen pro Bedingung. \* =  $p < 0,05$  vs. Kontrolle; # =  $p < 0,05$  vs. PE.

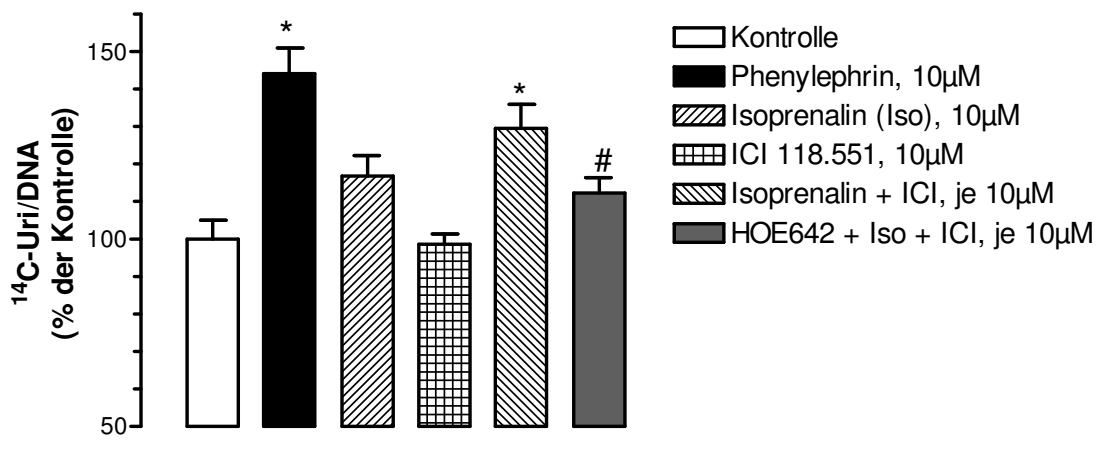
### 3.3.3 Effekte der NHE-1-Hemmung durch Cariporide auf andere Hypertrophie-Stimuli

#### 3.3.3.1 Effekte der NHE-1-Hemmung auf $\beta$ -adrenerge Stimulation

Die Induktion der Hypertrophie durch Phenylephrin wird durch  $\alpha_1$ -adrenerge Rezeptoren vermittelt (PÖNICKE ET AL., 2003). Frisch isolierte adulte Rattenkardiomyozyten besitzen zusätzlich  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren, wobei eine deutliche Dominanz in der Expression (bis zu 80%) des  $\beta_1$ -Rezeptors auftritt (STEINBERG, 1999). Die Aktivierung des vorwiegend im Herzen vorkommenden  $\beta_1$ -Rezeptors kann einerseits die  $\alpha_1$ -adrenerg induzierte Hypertrophie reduzieren, wie unter Versuchen mit Noradrenalin gezeigt (SCHLÜTER & PIPER, 1992), aber andererseits auch selbst zur Hypertrophie führen (SCHÄFER ET AL., 2000).

Im folgenden wurde der Einfluss von Cariporide auf die RNA-Neusynthese bei reiner  $\beta_1$ -adrenerger Stimulation untersucht. Zur selektiven Stimulation des  $\beta_1$ -Adrenozeptors wurden die Kardiomyozyten zunächst für 15 Minuten mit dem spezifischen  $\beta_2$ -Adrenozeptor-Antagonisten ICI 118.551 (ICI, 10µM) präinkubiert. Anschließend wurde Isoprenalin (ISO, 10µM), ein unspezifischer Stimulator für  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren für 24 Stunden den Kulturschalen zugefügt. Einigen Kulturschalen wurde diese Kombination erst nach 15-minütiger Vorinkubation mit Cariporide (HOE642, 10µM) zugesetzt. Als Positivkontrolle ( $\alpha_1$ -

adrenerge Hypertrophie-Induktion) wurden in diesen Versuchen immer Phenylephrin (PE, 10 $\mu$ M) mitgeführt (Abbildung 27).



**Abbildung 27: Hemmung der Subtyp-spezifischen  $\beta_1$ -adrenergen Stimulation mittels Cariporide.** Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM eines repräsentativen Experiments mit  $n \geq 6$  Kulturschalen pro Bedingung. \* =  $p < 0,05$  vs. Kontrolle; # =  $p < 0,05$  vs. ICI + ISO.

Die gleichzeitige Stimulation beider  $\beta$ -Adrenozeptor-Subtypen mittels Isoprenalin bewirkte keine signifikante Veränderung der RNA-Syntheserate, verglichen zu unstimulierten Kontrollzellen. Die Subtyp-spezifische Stimulation des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors hingegen erhöhte zwar die RNA-Neusynthese signifikant, aber die RNA-Neusyntheserate war im Vergleich zu Phenylephrin geringer.

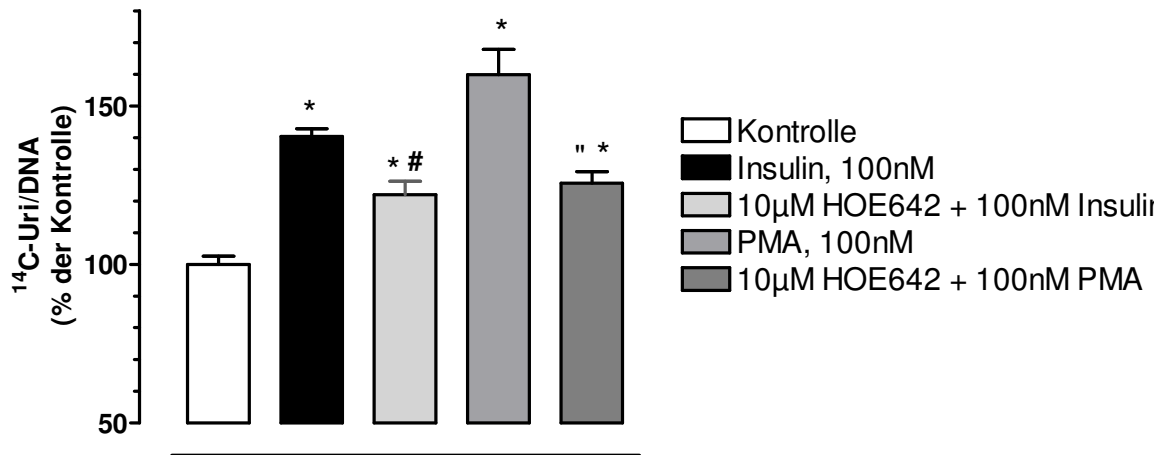
Die Vorinkubation mit Cariporide reduzierte die  $\beta_1$ -subtypspezifische Stimulation der RNA-Neusynthese zwar signifikant, aber nicht auf Kontrollniveau. In den eingesetzten Konzentrationen hatten die hier verwendeten Inhibitoren keinen signifikanten Einfluss auf die basale RNA-Syntheserate der Kardiomyozyten.

### 3.3.3.2 Effekte der NHE-1-Inhibition auf Insulin- bzw. PMA-Stimulation

Um die zelluläre Ebene des Einflusses der NHE-1-Hemmung durch Cariporide besser zu charakterisieren, wurden mittels weiterer Simulatoren andere Rezeptoren und Signaltransduktionswege der Hypertrophie aktiviert und die RNA-Neusyntheserate bestimmt. Mit dem physiologischen Hypertrophie-Stimulus Insulin (Ins, 100nM) wurde ein anaboler Stimulus getestet. Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA, 100nM), das vor allem Stressfaktoren-Signaltransduktionswege aktiviert, gilt dagegen als kataboler Stimulus.

Sowohl durch Insulin als auch PMA wurde die RNA-Neusyntheserate signifikant, um bis zu 1,5-fach gesteigert (Abbildung 28). Cariporide (10 $\mu$ M) verminderte die Insulin- und PMA-

induzierte Steigerung der RNA-Syntheserate zwar signifikant, es wurde aber keine vollständige Reduktion auf Kontrollwertniveau erreicht.



**Abbildung 28: Einfluss der NHE-1-Hemmung auf die RNA-Synthese nach Insulin- (Ins, 100nM) bzw. PMA-Stimulation (PMA, 100nM)** Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM eines repräsentativen Experiments mit  $n \geq 6$  Kulturschalen pro Bedingung (A) Kontrollzellen, (B) Insulin, 100nM, (C) 10µM Cariporide + 100nM Insulin, (D) 100nM PMA, (E) 10µM Cariporide + 100nM PMA. \* =  $p < 0,05$  vs. Kontrolle, ° =  $p < 0,05$  vs. Insulin; # =  $p < 0,05$  vs. PMA

### **3.4 Effekte des Natrium-Calcium-Austauscher-Inhibitors SEA0400**

Die bis jetzt gezeigten Ergebnisse belegen eine eindeutige Rolle des NHE-1 bei der  $\alpha_1$ -adrenerg induzierten Hypertrophie. In weiteren Experimenten wurde untersucht, wie die Aktivierung des NHE-1 in Kardiomyozyten zu einer Myokardhypertrophie führen könnte. Am naheliegendsten war, dass es aufgrund einer erhöhten intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Ionenkonzentration, bedingt durch die Aktivierung des NHE-1 (VAUGHAN-JONES ET AL., 1990), zur Aktivierung des Natrium-Calcium-Austauschers (NCX) im „*Reverse Mode*“ kommt. Der *Reverse Mode* des NCX ist die Hauptursache einer zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung in Kardiomyozyten. Über einen elektrochemischen Gradienten fördert er Natriumionen aus der Zelle hinaus und schleust Calciumionen in die Zelle hinein. Der NCX kann im *Reverse Mode* durch den spezifischen Inhibitor SEA0400 ( $\text{IC}_{50}$ : 0,03-0,04nM) gehemmt werden (MATSUDA ET AL., 2001; TANAKA ET AL., 2002).

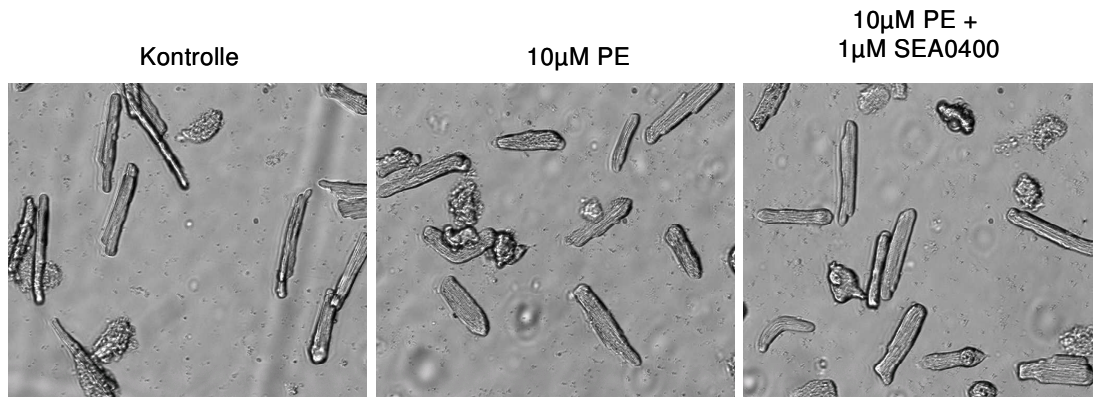
Um zu klären, welche Bedeutung der NCX für die  $\alpha_1$ -adrenerge vermittelte Induktion der myokardialen Hypertrophie hat, wurde der Einfluss von SEA0400 auf die Steigerung des Zellvolumens, der Querschnittsfläche sowie der RNA- und Protein-Syntheserate untersucht.

#### **3.4.1 Effekt von SEA0400 auf Hypertrophieparameter nach $\alpha_1$ -Adrenozeptor-Stimulation**

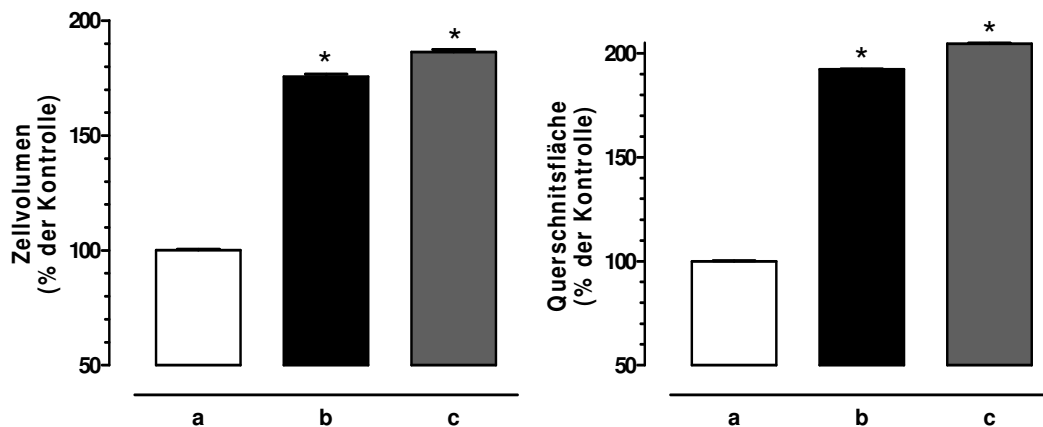
Der NCX-Inhibitor SEA0400 wurde in einer Konzentration von 1 $\mu\text{M}$  getestet. Im Gegensatz zu den NHE-1-Inhibitoren, konnte durch den NCX-Inhibitor SEA0400 keine Hemmung des Zellvolumens oder der Querschnittsflächen der einzelnen Zellen nach  $\alpha_1$ -adrenerger Stimulation (PE, 10 $\mu\text{M}$ ) erreicht werden (Abbildung 29A und B).

Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis nach 15-minütiger Vorinkubation mit SEA0400 und anschließender 24-stündiger Inkubation mit Zusatz von Phenylephrin (PE, 10 $\mu\text{M}$ ). Der Unterschied der beiden stimulierten Gruppen zu den unstimulierten Kontrollzellen ist bereits optisch zu erkennen (Abbildung 29A).

A



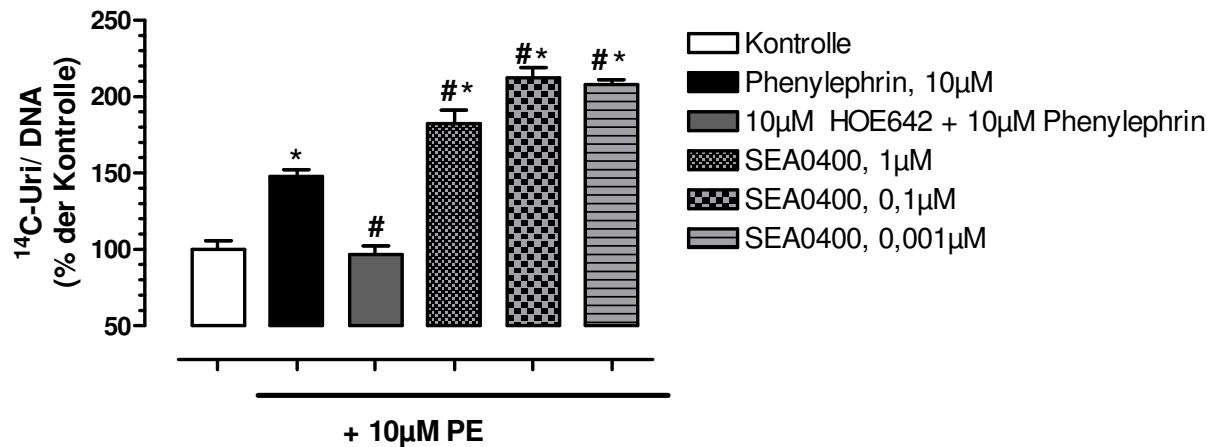
B



**Abbildung 29: Einfluss der NCX-Hemmung durch SEA0400 (1µM) auf die Zunahme des Zellvolumens und der Querschnittsfläche der einzelnen Kardiomyozyte nach Phenylephrin-Stimulation.** (A) Myozytenmorphologie nach 24-stündiger Inkubation (80fache Vergrößerung). (B) Zellvolumen und Querschnittsfläche unter SEA0400 Behandlung Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus 3 Experimenten mit 90-170 Zellen pro Bedingung. Zellen aus unstimulierter Kultur (a), nach Phenylephrin-Stimulation (PE 10µM; b), sowie nach 15-minütiger Vorinkubation mit SEA0400 und anschließender PE-Stimulation (1µM; c) wurden analysiert. Das Zellvolumen und die Querschnittsfläche wurden manuell ausgewertet. \* =  $p < 0,05$  vs. unstimulierte Kulturen.

Als weiterer Hypertrophieparameter wurde die Hemmung des NCX hinsichtlich der RNA-Neusynthese untersucht (Abbildung 30).

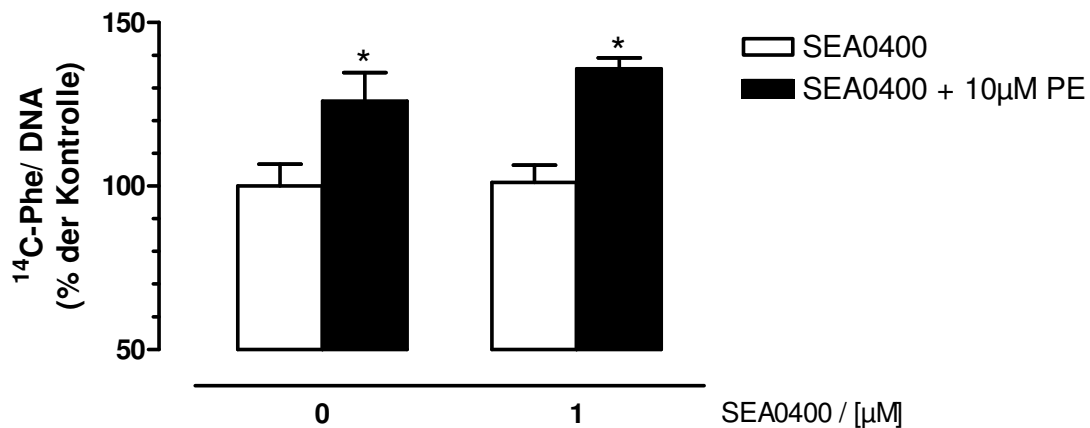




**Abbildung 30: Effekt von SEA0400 auf den [<sup>14</sup>C]-Uridin-Einbau.** Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM eines repräsentativen Experiments mit  $n = 8$  Kulturschalen pro Bedingung. \* =  $p < 0,05$  vs. Kontrolle; # =  $p < 0,05$  vs. Phenylephrin.

Die Vorinkubation (15min) mit SEA0400 konnte die  $\alpha_1$ -adrenerg vermittelte RNA-Neusynthese konzentrationsabhängig nicht mindern. Alle untersuchten SEA0400-Konzentrationen (0,01 μM bis 1 μM) erhöhten den Uridin-Einbau der Kardiomyozyten sogar noch signifikant gegenüber ausschließlich Phenylephrin-behandelten Kulturen. SEA0400 alleine hatte dagegen keinen Effekt auf die basale RNA-Neusynthese im Vergleich zu unstimulierten Kulturen (Daten sind hier nicht gezeigt). 10 μM SEA0400 wurde in diesen Versuchsansätzen ebenfalls getestet, erwies sich aber als zytotoxisch (Daten sind hier nicht gezeigt). Als Positivkontrolle zeigte Cariporide (10 μM) in diesen Versuchen immer eine vollständige Absenkung der RNA-Neusynthese auf Kontrollwerte.

Neben der RNA-Neusyntheserate wurde auch der Effekt von SEA0400 auf die Proteinsynthese der Kardiomyozyten nach  $\alpha_1$ -adrenerger Stimulation untersucht (Abbildung 31). Analog den entsprechenden Untersuchungen der NHE-1-Inhibition wurden Kardiomyozyten wiederum zunächst für 15 Minuten mit SEA0400 versetzt und anschließend mit Phenylephrin (PE, 10 μM) in Anwesenheit von [<sup>14</sup>C]-Phenylalanin-haltigem CCT-Joklik-Medium für 24 Stunden inkubiert.



**Abbildung 31: Einfluss der NCX-Hemmung durch SEA0400 (1 μM) nach  $\alpha_1$ -adrenerger Stimulation auf die Proteinbiosynthese.** Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM eines repräsentativen Experiments mit  $n = 8$  Kulturschalen pro Bedingung. \* =  $p < 0,05$  vs. Kontrolle.

Die Vorinkubation mit SEA0400 (1 μM) hatte keinen hemmenden Einfluss auf die signifikant gesteigerte Proteinsynthese. In der eingesetzten Konzentration besaß SEA0400 alleine keinen Einfluss auf die basale Proteinsyntheserate der Kardiomyozyten.

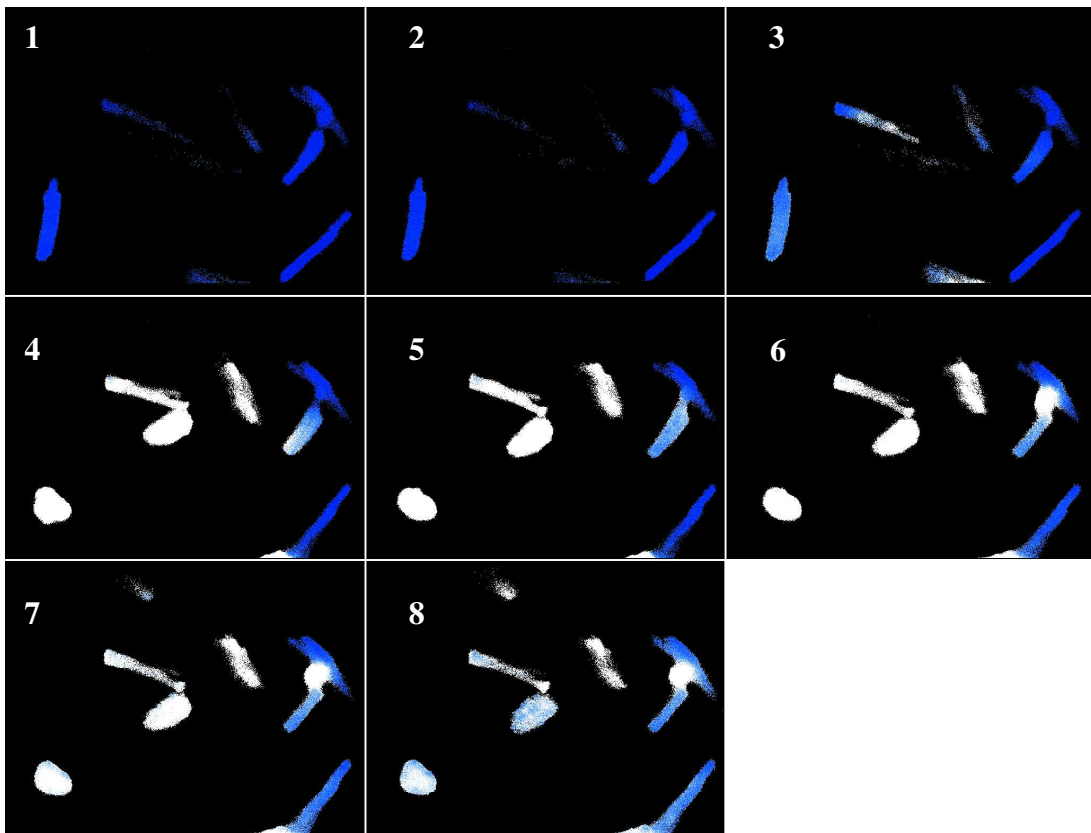
### 3.4.2 Wirknachweis von SEA0400 auf adulte Kardiomyozyten

Um sicherzustellen, dass SEA0400 in der vorwiegend verwendeten Konzentration von 1 μM den NCX in adulten Kardiomyozyten hemmt, wurde dieser im „Reverse Mode“ aktiviert und über die Zunahme an intrazellulärem Calcium gemessen (Abbildung 32). Hierzu wurden die Kardiomyozyten mit  $\text{Na}^+$ -freiem Medium superfundiert, was zu einer maximalen Aktivierung des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers im „Reverse Mode“ führte.

Abbildung 32 zeigt eine Bildsequenz von 8 aufeinander folgenden Aufnahmen, über einen Zeitraum von 5 Minuten, nach Umstellung der Versuchsbedingung auf  $\text{Na}^+$ -freies Medium. Der Anstieg der Calcium-sensitiven Fura-2-Einlagerung in isolierten Kardiomyozyten, bei Superperfusion mit  $\text{Na}^+$ -freiem Medium, ist durch die Weiß-Färbung des Zytosols der einzelnen Zellen zu erkennen. Der Calcium-sensitive Farbstoff Fura-2 ändert seine Fluoreszenz in Abhängigkeit der vorliegenden Calcium-Ionenkonzentration. Überschreitet die Calcium-Einlagerung einen für die Zelle nicht mehr tolerierbaren Wert, resultiert eine irreversible Hyperkontraktion und das Absterben der Zelle.

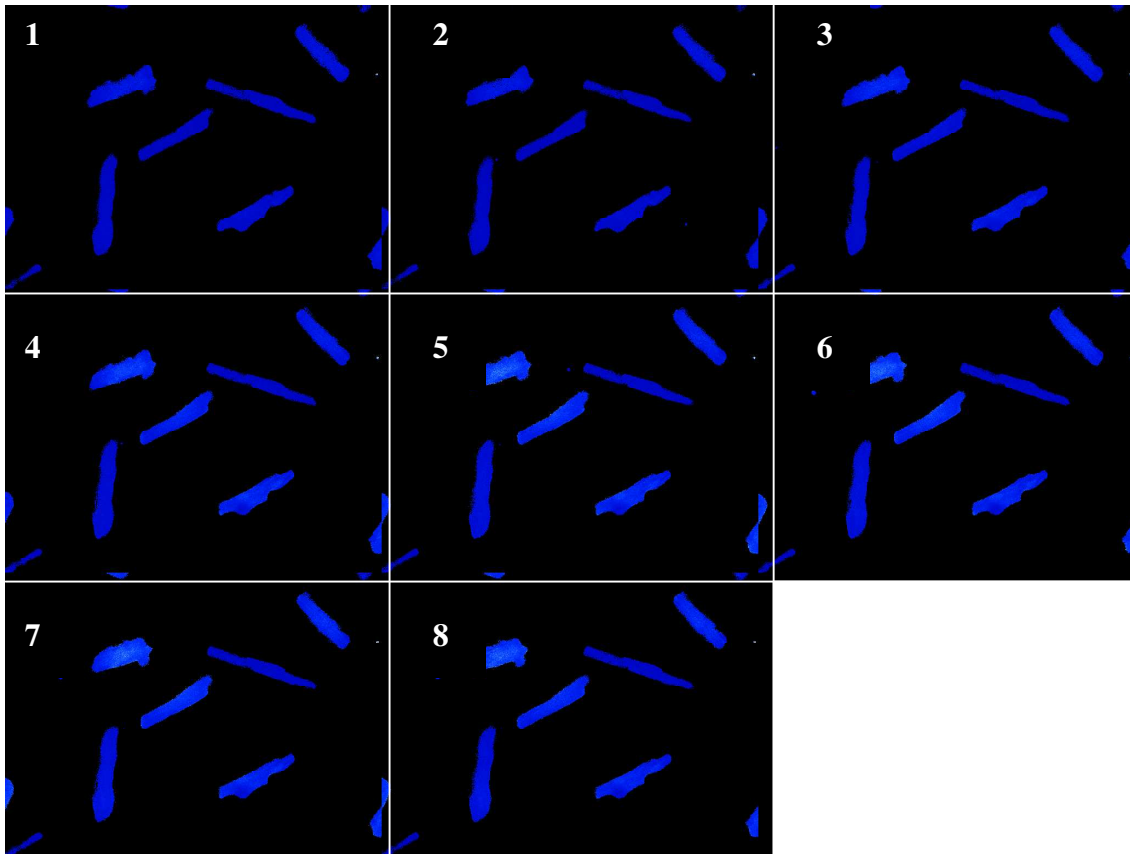
Nach ca. 80 Sekunden kommt es zu einem sichtbaren Einstrom von Calciumionen über den NCX. Im weiteren Zeitverlauf des Experiments zeigen letztendlich fast alle Kontrollzellen

eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung des Zytosols, gekennzeichnet durch die weiße Färbung. Einige Zellen beginnen bereits vor Ablauf von 120 Sekunden zu hyperkontrahieren und abzurunden.



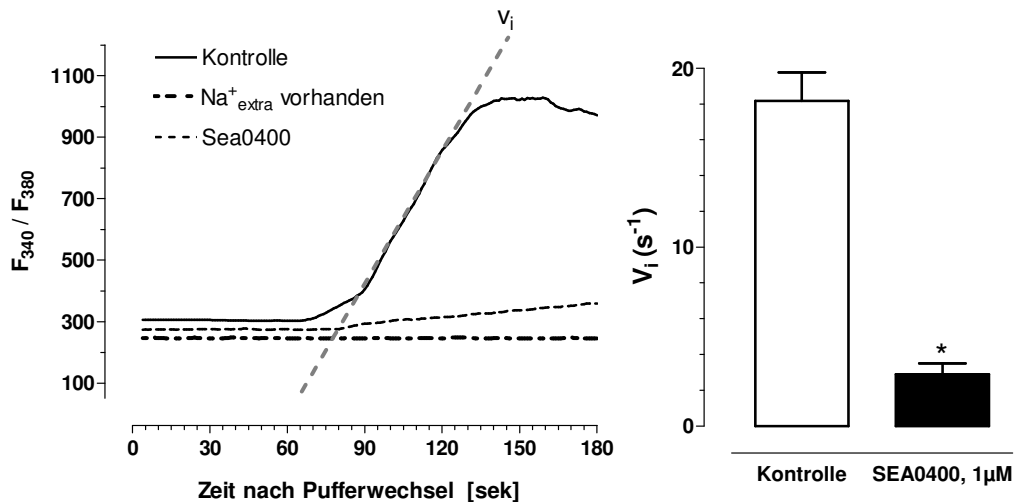
**Abbildung 32: Zeitverlauf des  $\text{Na}^+$ -Entzugsexperiments unter Kontrollbedingungen.**

Wurden die Kardiomyozyten 15min vor Beginn des  $\text{Na}^+$ -Entzugs mit  $1\mu\text{M}$  SEA0400 vorinkubiert und  $1\mu\text{M}$  SEA0400 über die gesamte Versuchsdauer im Perfusionsverlauf appliziert, so ist der Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einlagerung fast vollständig unterbunden. (Abbildung 33). Es wurde eine minimalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das Zytosol der Zellen festgestellt, jedoch konnte kein Absterben der Zellen durch Hyperkontraktion beobachtet werden.



**Abbildung 33: Zeitverlauf des Na<sup>+</sup>-Entzugsexperiments unter Vorinkubation und konstanter Anwesenheit von 1µM SEA0400. Alle 40 Sekunden, über 5 Minuten wurde eine Aufnahme der Zellen gemacht.**

Abbildung 34A zeigt im Folgenden eine repräsentative Original-Registrierung des Fura-2-Verhältnisses (340/380nm) von 5 Kardiomyozyten bei Superperfusion mit Na<sup>+</sup>-haltigem, Na<sup>+</sup>-freiem (Kontrolle) und Na<sup>+</sup>-freiem, aber SEA0400- (1µM) haltigem Perfusionsmedium. Der alleinige Na<sup>+</sup>-Entzug führte zu einer massiven Erhöhung des Fura-2-Verhältnisses, das auf einen Anstieg der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration zurückzuführen ist. Wurde der Na<sup>+</sup>-Entzug in Gegenwart von 1µM SEA0400 durchgeführt, blieb der Anstieg des Fura-2-Verhältnisses nahezu aus.



**Abbildung 34: Na<sup>+</sup>-Entzugsexperiment: Zeitlicher Verlauf des Anstiegs der Fura-2-Ratio (340/380nm, Original-Registrierung) in isolierten Kardiomyozyten bei Superperfusion mit Na<sup>+</sup>-freiem Medium.** (A) Original-Registrierungs-Abbildung: Es wurden folgende experimentelle Protokolle durchgeführt: Na<sup>+</sup>-freie Kontrollexperimente, Experimente in Gegenwart von 1 μM SEA0400 und Kontrollexperimente in Gegenwart von Natrium im Perfusionspuffer (Na<sup>+</sup><sub>extra</sub> vorhanden). (B) Maximale Aktivität des NCX gemessen anhand der Anstiegsgeschwindigkeit ( $V_i$ ) der Fura-2-Ratio in den Natrium-Entzugsexperimenten. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n \geq 15$  Zellen pro Bedingung. \* =  $p < 0,05$  gegenüber den ausschließlich Na<sup>+</sup>-freien Bedingungen.

Abbildung 34B zeigt die komplette Auswertung aller betrachteten Zellen anhand der maximalen initialen Calciumionen-Einflussgeschwindigkeit ( $V_i$ ). SEA0400 (1 μM) vermindert fast vollständig den Anstieg von  $V_i$  gegenüber den Na<sup>+</sup>-freien Kontrollgruppen.

### **3.5 Wirkung von NHE-1-Inhibitoren auf die Phosphorylierung verschiedener, bekannter intrazelluläre Kinasen der Hypertrophie**

Bisher konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zur Inhibition des NHE-1, die Hemmung des Natrium-Calcium-Austauschers mittels SEA0400 wahrscheinlich nicht in Zusammenhang mit einer Vermeidung des Hypertrophie-Prozesses in adulten Rattenkardiomyozyten gebracht werden kann.

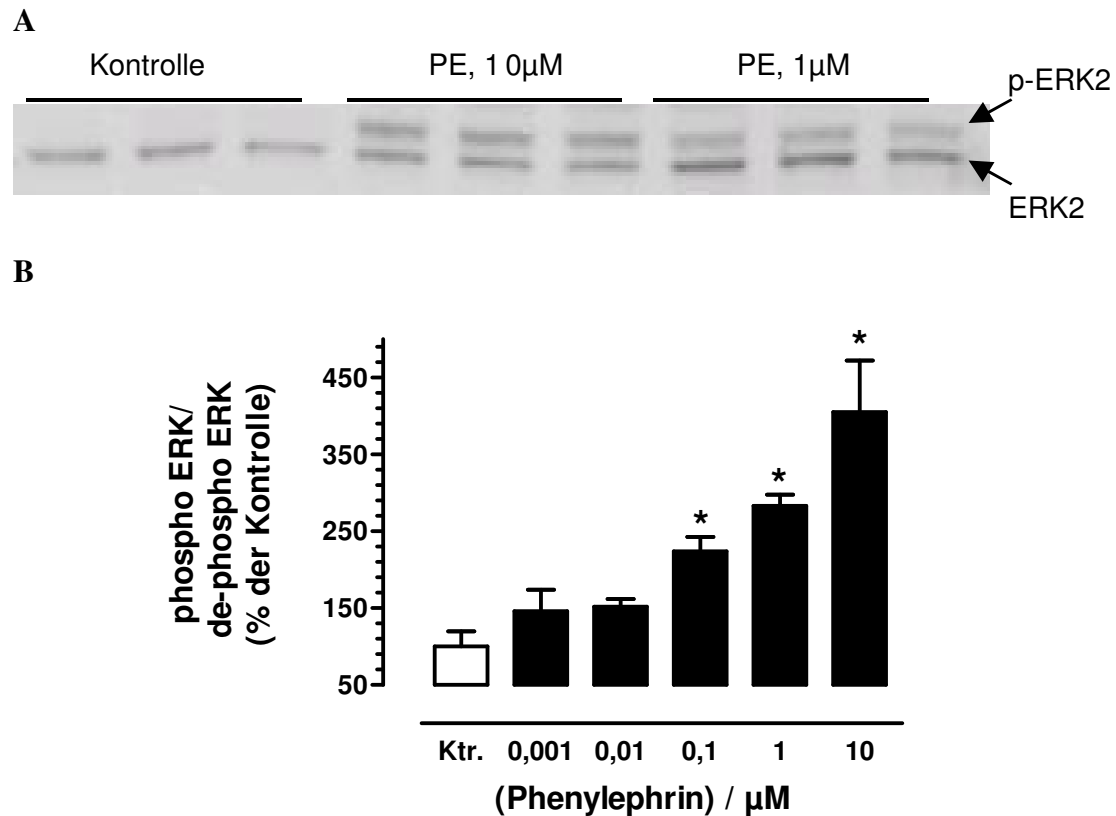
Im Folgenden wurde daher der Focus zum Entwicklungsprozess einer Hypertrophie auf intrazelluläre Kinasen und Proteine gelegt, die für eine Entwicklung kardialer Hypertrophie von Bedeutung sein könnten und z.T. bekanntermaßen den NHE-1 phosphorylieren. Im Rahmen der nachfolgenden Versuche wurden einige bereits bekannte Signaltransduktionswege explizit unter Cariporide-Inkubation untersucht.

#### **3.5.1 Aktivierung und Rolle der ERK nach $\alpha_1$ -Adrenozeptor-Stimulation**

Der häufig mit Hypertrophie und der NHE-1-Phosphorylierung in Zusammenhang gebrachte Signaltransduktionsweg von MAP-Kinasen (Mitogen-aktivierte Phospho-Kinasen) stellt über die Phosphorylierung und Regulation vielfältiger Transkriptionsfaktoren eine wichtige Verbindung zwischen externen Stimuli und dem Zellkern dar. Die MAP-Kinasen können in drei Unterfamilien eingeteilt werden, die „*extracellular signal regulated kinases*“ (ERKs), „*c-Jun N-terminal kinases*“ (JNKs) und p38 MAPK. ERK2 phosphoryliert die zytosolische Domäne des NHE-1 mit einer Stöchiometrie von 1 Mol Phosphat pro Mol Protein (KUSHURA ET AL. 1998; MOOR & FLIEGEL, 1999; WANG ET AL., 1997)

Um eine  $\alpha_1$ -adrenerg vermittelte Phosphorylierungssteigerung der ERK zu untersuchen, wurden ventrikuläre Kardiomyozyten 15 Minuten mit Phenylephrin in Konzentrationen von 0,001 bis 10  $\mu$ M inkubiert. In Vorversuchen erwiesen sich 15 Minuten als optimaler Zeitpunkt für diese ansonsten transiente Aktivierung.

Der geringe Molekulargewichtsunterschied zwischen nicht-phosphorylierter und phosphorylierter ERK-Kinase wurde durch ein spezielles, hochauflösendes Gel-Retardierungs-System bestimmt. Die phosphorylierte und damit aktivierte Fraktion der ERK2 zeigte während dabei ein verzögertes Laufverhalten, wodurch sich, nach dem Immuno-Blot mit einem polyklonalen Antikörper gegen die ERK2, zwei distinkte Banden unterscheiden ließen (Abbildung 35A).

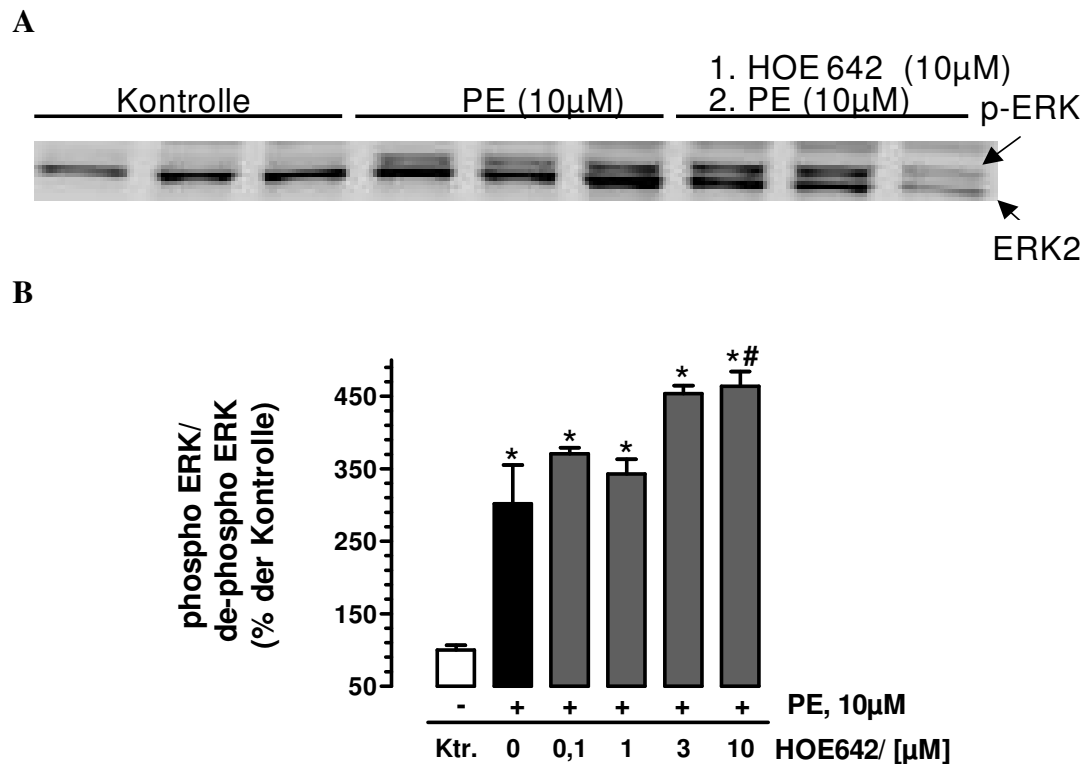


**Abbildung 35: Phosphorylierung der ERK2 mittels verschiedener Phenylephrin-Konzentrationen;** (A) Charakterischer Immuno-Blot gegen die ERK. Die obere Bande, die nach 15-minütiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen mit Phenylephrin (PE, 10 und  $1\mu\text{M}$ ) erschien, zeigte während der SDS-PAGE ein verzögertes Laufverhalten und entsprach der phosphorylierten und damit aktivierten Form. (B) Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der gesteigerten ERK-Phosphorylierung in Abhängigkeit der eingesetzten Phenylephrin-Konzentrationen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM eines repräsentativen Experiments mit  $n = 3$  Kulturschalen pro Bedingung. \* =  $p < 0,05$  vs. Kontrolle.

Das Verhältnis von aktivierter ERK2-Fraktion zur dephosphorylierten-ERK2-Fraktion gab an, welcher Anteil der ERK in der aktivierten Form vorlag und wurde im Folgenden als Prozent der Kontrolle (phospho-ERK2/ dephospho-ERK2) angegeben.

Es konnte ein konzentrationsabhängiger Anstieg der ERK2-Phosphorylierung mit einer maximalen signifikanten Phosphorylierung bei einer Inkubation von  $10\mu\text{M}$  Phenylephrin gezeigt werden (Abbildung 35B). Im folgenden wurden daher die Zellen mit  $10\mu\text{M}$  Phenylephrin für 15 Minuten inkubiert.

Um zu klären, ob NHE-1-Inhibitoren in diesen Signaltransduktionsweg eingreifen, wurden die entsprechenden Phosphorylierungsexperimente zunächst mit Cariporide ( $10\mu\text{M}$ ) auf die Inhibition dieser bestimmten Kinasen hin untersucht. Auch in diesen Experimenten führte Phenylephrin (PE,  $10\mu\text{M}$ ) zu einer stark signifikanten Phosphorylierung der ERK (Abbildung 36A und B).

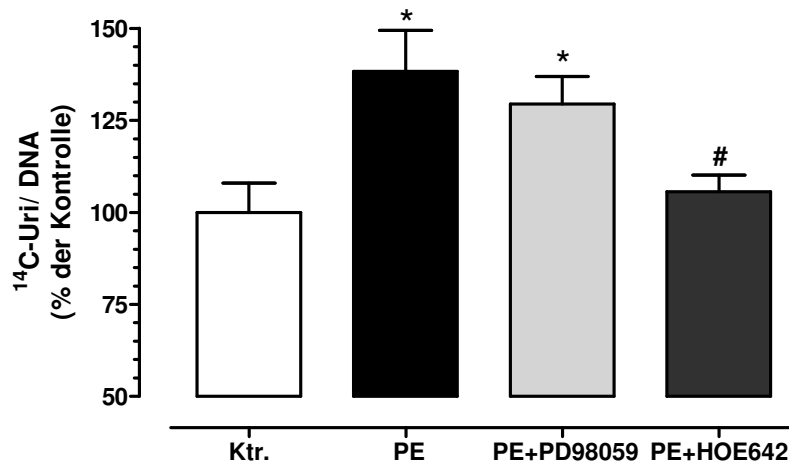


**Abbildung 36: Einfluss der NHE-1-Inhibition auf die ERK-Phosphorylierung.** (A) Ausschnitt eines charakteristischen Western Blot gegen die 42kDa-Isoform der ERK nach Vorinkubation mit Cariporide (HOE642, 10µM). (B) Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der durch Phenylephrin (PE, 10µM) gesteigerten ERK-Phosphorylierung in Abhängigkeit der eingesetzten Cariporide-Konzentrationen (HOE642). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM eines repräsentativen Experiments mit  $n = 3$  Kulturschalen pro Bedingung \* =  $p < 0,05$  vs. Kontrolle; # =  $p < 0,05$  vs. PE.

Die Vorinkubation (15min) mit verschiedenen Cariporide-Konzentrationen (0,1µM bis 10µM) zeigte allerdings keinen Einfluss auf die ERK-Phosphorylierung nach Phenylephrin-Stimulation. Überraschenderweise verstärkte Cariporide in der hier am höchsten untersuchten Konzentration von 10µM den Phosphorylierungsstatus von ERK2 noch signifikant gegenüber den reinen Phenylephrin-behandelten Kulturen. Der Einsatz eines weiteren NHE-1-Inhibitors, S4890, hatte ebenfalls keinen inhibierenden Effekt auf die Phosphorylierung von ERK2.

Obwohl die Phosphorylierung der ERK nicht durch den relevanten Hypertrophie-Inhibitor Cariporide gehemmt wurde, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass dem ERK-Signaltransduktionsweg nicht doch eine Rolle bei der Entstehung einer kardialen Hypertrophie zukommt. Aus diesem Grund wurde die Hemmung der MEK-1-Kinase (mitogen activated ERK activating kinase), die in der Signaltransduktionskaskade der ERK vorgeschaltet ist und diese aktiviert, mittels des spezifischen MEK1-Kinase-Inhibitor PD98059 (10µM) (Alessi et al., 1995) hinsichtlich der Steigerung der RNA-Neusynthese untersucht (Abbildung 37).





**Abbildung 37: Einfluss des MEK-1-Inhibitors PD98059 (PD, 10 $\mu\text{M}$ ) auf die nach  $\alpha_1$ -Adrenozeptor-Stimulation induzierte RNA-Synthese.** Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n = 8$  Schalen pro Bedingung. Aufgeführt sind neben der Kontrolle (Ktr.), Phenylephrin (PE, 10 $\mu\text{M}$ ), PD98059 (10 $\mu\text{M}$ ), auch die Kombination aus Phenylephrin (PE, 10 $\mu\text{M}$ ) und Cariporide (HOE642, 10 $\mu\text{M}$ ). \* =  $p < 0,05$  vs. Kontrolle; # =  $p < 0,05$  vs. PE.

Phenylephrin steigerte die RNA-Neusyntheserate im Verlauf der 24-stündigen Inkubation signifikant im Vergleich zu unstimulierten Kulturen. Die zusätzliche Inkubation mit dem spezifischen Inhibitor der MEK-1, PD98059 (PD, 10 $\mu\text{M}$ ), konnte den Einbau von Uridin in die Kardiomyozyten nicht signifikant mindern. Cariporide (10 $\mu\text{M}$ ) als aktive Kontrolle hingegen reduzierte die RNA-Syntheserate signifikant auf Kontrollwertniveau.

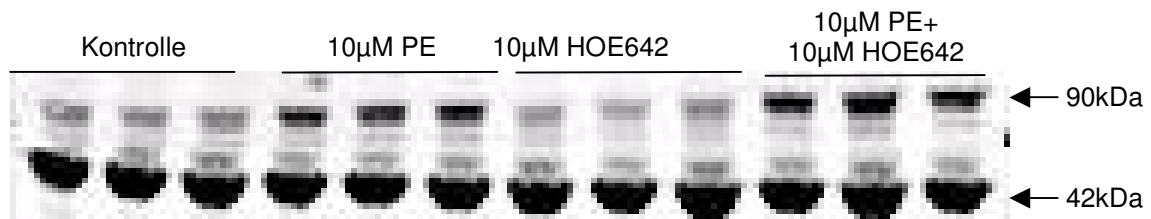
### 3.5.2 Einfluss auf die Phosphorylierung der p90<sup>RS</sup>-Kinase

Von der p90<sup>RS</sup>-Kinase ist bekannt, dass sie u.a. direkt zur Phosphorylierung und damit Aktivierung des NHE-1 in verschiedenen Zelltypen, einschließlich adulten Rattenkardiomyozyten beiträgt (TAKAHASHI ET AL., 1999). Die p90<sup>RS</sup>-Kinase ist eine Serin/Threonin Kinase, die u.a. unterhalb der ERK arbeitet und von dieser Kinase reguliert werden kann (SMITH ET AL., 1999). In der vorliegenden Arbeit stellte sich nun die Frage, ob der Einsatz des NHE-1-Inhibitors Cariporide (10 $\mu\text{M}$ ) einen Einfluss auf die Phenylephrin-induzierte Phosphorylierung der p90<sup>RSK</sup> besitzt.

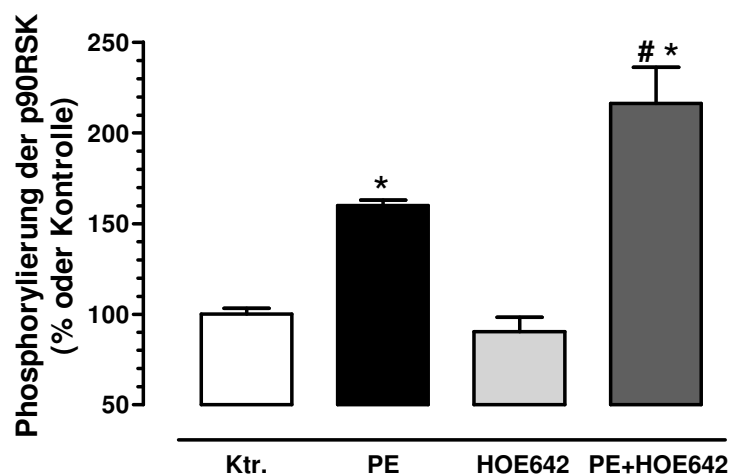
Aus einer vorangegangenen, hier nicht gezeigten Zeitkinetik zur Phosphorylierung der p90<sup>RSK</sup> nach  $\alpha_1$ -adrenerger Stimulation, ergab sich ein transientes Aktivierungsmuster mit einem Maximum bei 15 Minuten. Wie in Abbildung 38(A und B) gezeigt, konnte unter Phenylephrin-Stimulation eine Verdoppelung der basalen p90<sup>RSK</sup>-Phosphorylierung beobachtet werden. Cariporide alleine hatte keinen Einfluss auf die Phosphorylierung der

p90<sup>RSK</sup>. Die Vorinkubation mit Cariporide verstärkte auch bei dieser Kinase die Phosphorylierung signifikant gegenüber den Phenylephrin-behandelten Zellen.

A

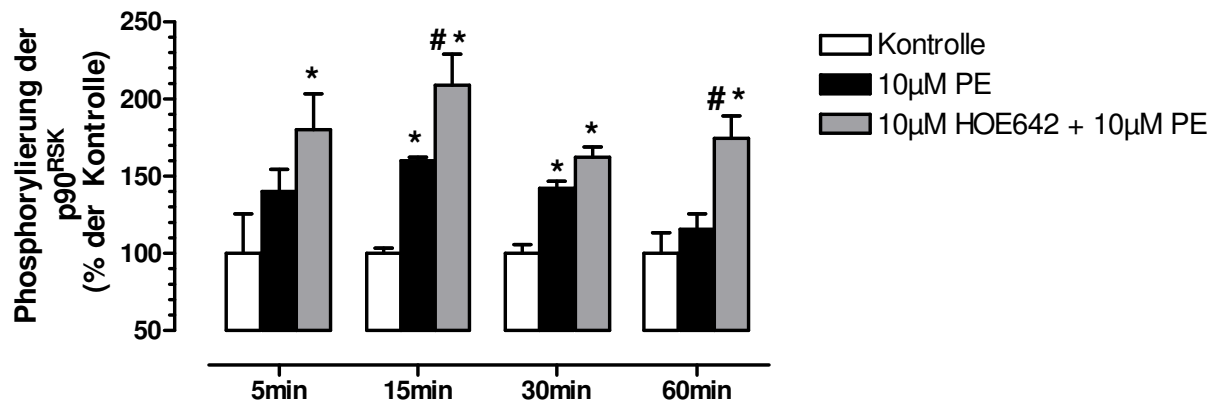


B



**Abbildung 38: Phosphorylierung der p90<sup>RSK</sup>;** (A) Charakteristischer Western Blot gegen die phosphorylierte Fraktion der p90<sup>RS</sup>-Kinase (p90<sup>RSK</sup>; 90kDa), sowie gegen Aktin (42kDa als Beladungskontrolle). Auftragsprotokoll: Kontrolle, Phenylephrin (PE, 10µM), Cariporide (10µM) und die Kombination aus Phenylephrin (PE, 10µM) + Cariporide (10µM). (B) Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus n = 3 Kulturschalen pro Bedingung normalisiert auf die Beladungskontrolle. \* = p < 0,05 vs. Kontrolle, # = p < 0,05 vs. PE.

Erstaunlicherweise hielt die vermehrte Phosphorylierung des p90<sup>RSK</sup>-Proteins bedingt durch die Anwesenheit von Cariporide trotz des eigentlich transienten Phosphorylierungsschemas der p90RSK an (Abbildung 39)

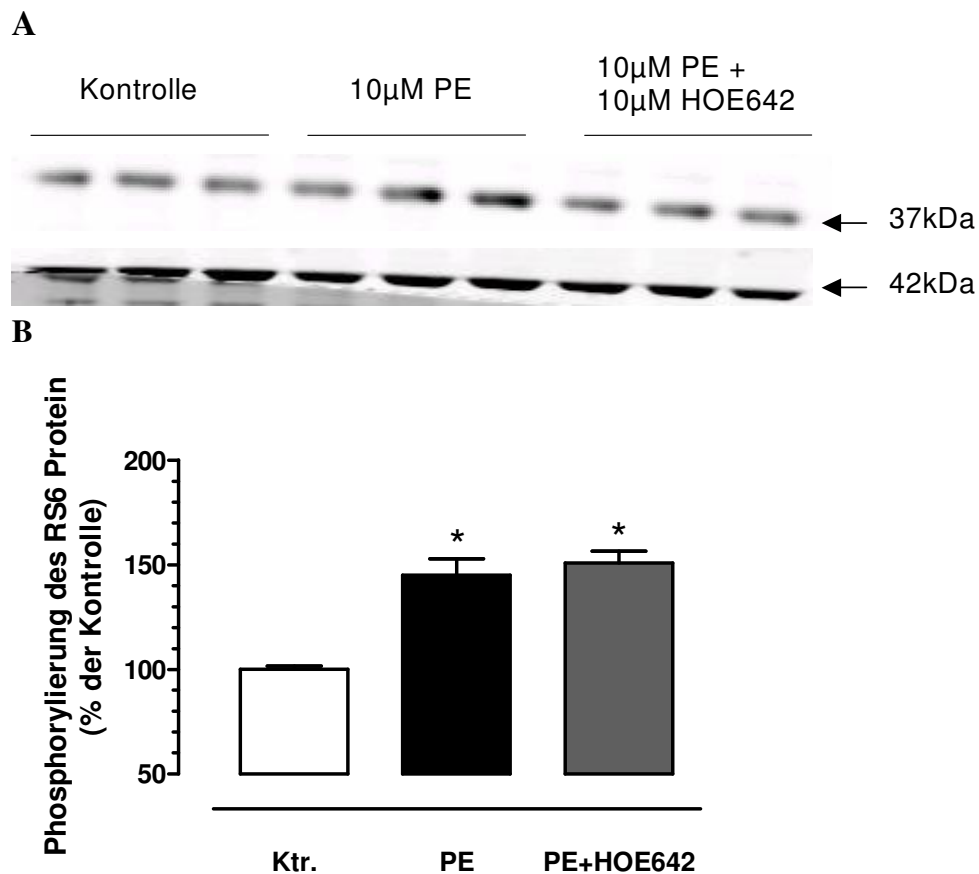


**Abbildung 39: Transiente Phosphorylierung der p90<sup>RSK</sup> durch 10µM Phenylephrin, aber keine Verminderung der p90<sup>RSK</sup>-Phosphorylierung durch Cariporide (10µM).** Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n = 3$  Kulturschalen pro Bedingung eines repräsentativen Western Blots (Daten sind hier nicht gezeigt). \* =  $p < 0,05$  vs. Kontrolle, # =  $p < 0,05$  vs. PE.

Die Vorinkubation mittels Cariporide verstärkte die Phosphorylierung der p90<sup>RSK</sup> fast über alle gewählten Zeitpunkte des gesamten Untersuchungszeitraumes sowohl signifikant gegenüber den Kontrollzellen als auch den Phenylephrin-behandelten Zellen.

### **3.5.3 Einfluss auf die Phosphorylierung des ribosomale S6 Protein**

Die p90 S6-Kinase phosphoryliert u.a. das ribosomale S6 Protein (RS6P, 37kDa). Die Phosphorylierung des RS6P korreliert mit einem Anstieg der Translationskapazität in den Kardiomyozyten (DUFNER & THOMAS, 1999). In den folgenden Experimenten wurde untersucht, inwieweit es unter Phenylephrin-Inkubation zur einer Phosphorylierung dieses Proteins kommt und inwiefern diese Phosphorylierung durch die Vorinkubation mit Cariporide beeinflusst werden kann (Abbildung 40A und B).

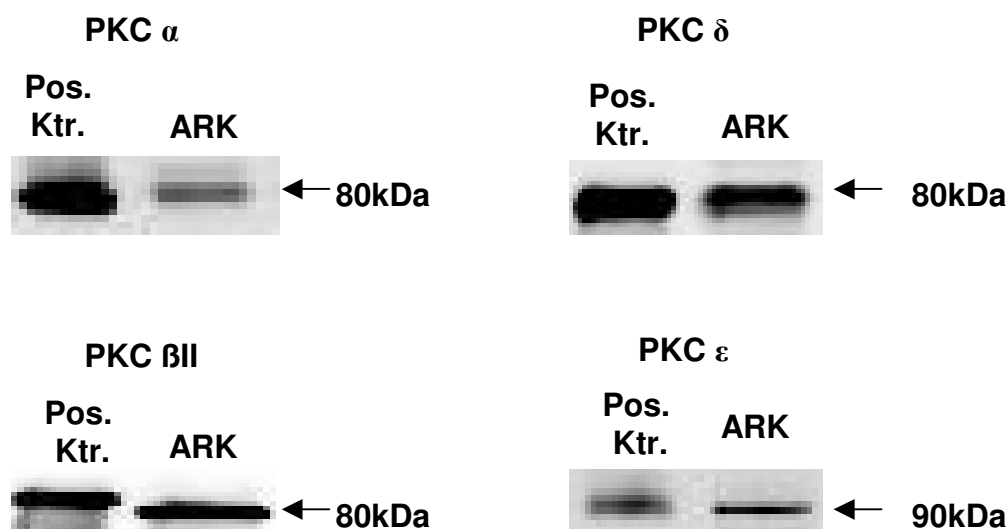


**Abbildung 40: Einfluss der NHE-1-Hemmung durch Cariporide (10µM) auf die Aktivierung des Ribsomalen S6 Proteins nach Phenylephrin-Stimulation (PE, 10µM).** (A) Repräsentativer Western Blot gegen die phosphorylierte Fraktion des RS6P (37kDa), sowie gegen Aktin (42kDa als Beladungskontrolle). Neben der Kontrolle sind Phenylephrin (PE, 10µM) und die Kombination Phenylephrin (PE, 10µM) + Cariporide (10µM) aufgetragen. (B) Auswertung des repräsentativen Experiments. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n = 3$  Kulturschalen pro Bedingung. \* =  $p < 0,05$  vs. Kontrolle.

Die  $\alpha_1$ -adrenerge Stimulation (PE, 10µM) führte zu einer ungefähren Verdopplung der Ribsomalen S6-Phosphorylierung. Die hier verwendete Inkubationszeit von 30 Minuten erwies sich aus einer Reihe von Experimenten als optimaler Zeitpunkt der Inkubation. Die Vorinkubation (15 min) mit Cariporide (10µM) beeinflusste die Phenylephrin-abhängige RS6P-Phosphorylierung nicht. In allen Experimenten hatte Cariporide alleine keinen Einfluss auf die basale RS6p-Phosphorylierung (Daten sind hier nicht gezeigt). Zum Nachweis gleichmäßiger Beladung wurde phospho-RS6P auf die Aktin-Expression bezogen.

### 3.5.4 Einfluss auf die Protein Kinase C

Die Protein Kinase C (PKC) gilt als weiterer, potentieller Aktivator des NHE-1 in diversen Zelltypen (HAYASAKI-KAJIWARA ET AL., 1999; für einen Überblick siehe AVKIRAN & HAWORTH, 2003). Derzeit sind mindestens 11 Isoformen der PKC bekannt (TSOUKA ET AL., 2002). Um die Rolle einiger PKC-Isoformen hinsichtlich einer  $\alpha_1$ -adrenergen Aktivierung in adulten Rattenkardiomyozyten zu untersuchen, wurde zunächst die Translokation einiger PKC-Isoformen im speziell aufgearbeiteten Gesamtproteinextrakt (siehe Material & Methoden 2.7.2) untersucht. Aus der Literatur ist bekannt, dass adulte Kardiomyozyten die PKC-Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$ II,  $\delta$  und  $\epsilon$  exprimieren können (WANG & PROUD, 2003). Im Folgenden wurde zunächst die Expression einiger PKC-Isoformen in Membranpräparationen adulter Rattenkardiomyozyten untersucht. Per Western Blot konnte in diesen Fraktionen die vier genannten PKC-Isoformen durch spezifische Primärantikörper nachgewiesen werden (Abbildung 41).



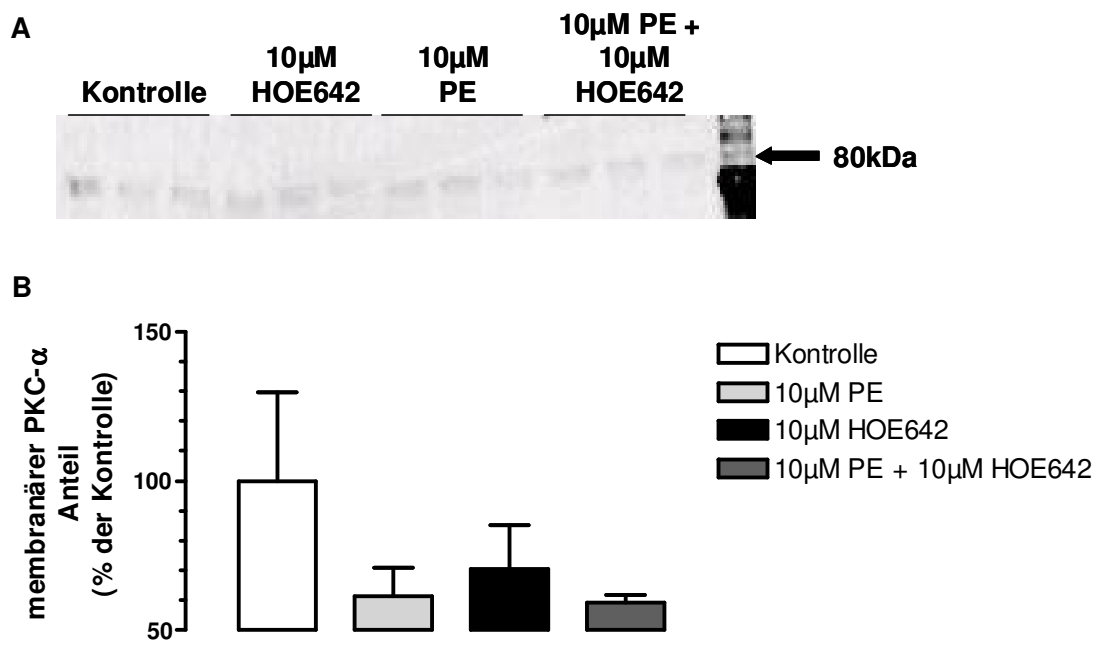
**Abbildung 41:** Charakteristischer Western Blot gegen die in adulten Kardiomyozyten vorliegenden PKC-Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$ II,  $\delta$  und  $\epsilon$ . Aufgetragen sind eine jeweilige rekombinante Positivkontrolle (Pos. Ktr. 0,4 $\mu$ g/  $\mu$ l; Invitrogen) und ein membranäres Lysat adulter Kardiomyozyten (ARK).

Aus der Literatur ist ebenfalls bereits bekannt, dass es nach  $\alpha_1$ -adrenerger Stimulation zu einer Translokation von PKC-Isoformen von der zytosolischen zur membranären Fraktion der Zelle kommen kann (PRASAD ET AL., 1992; ALBERT & FORD, 1999). Die Anwesenheit der PKC-Isoformen in der Membranfraktion der Zellen gilt dabei als Maß für ihre Aktivierung (TAKAYAMA ET AL., 2001).

In Vorversuchen erwiesen sich für PKC  $\epsilon$  2 Minuten und für die anderen 3 Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$ II und  $\delta$  je 5 Minuten als optimaler Zeitpunkt einer immer transienten Translokation nach Phenylephrin-Stimulation (Daten sind hier nicht gezeigt).

Um eine mögliche Rolle des NHE-1 nach Phenylephrin -Stimulation auf die Translokation der jeweiligen PKC-Isoformen näher zu charakterisieren, wurden ebenfalls Membran-Fractionen gesammelt, die 15 Minuten vor hypertropher Stimulation mit Cariporide (10 $\mu$ M) vorinkubiert waren.

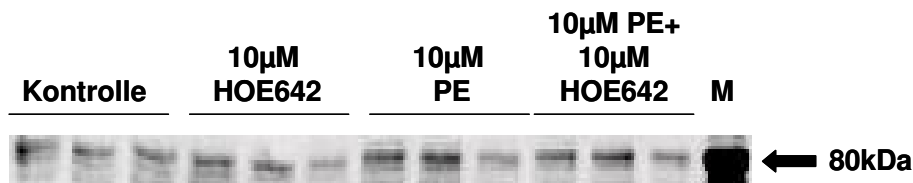
Die Stimulation des  $\alpha_1$ -adrenergen Rezeptors durch Phenylephrin führte zu keiner Aktivierung der sogenannten Calcium-abhängigen PKC-Isoformen  $\alpha$  und  $\beta$ II. (Abbildung 42, nur gezeigt für PKC  $\alpha$ ).



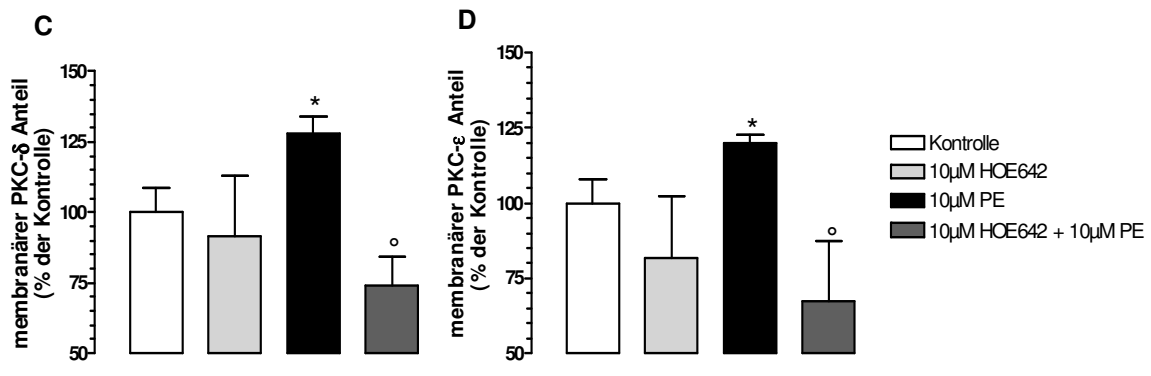
**Abbildung 42: Translokation der Calcium-abhängigen PKC-Isoform  $\alpha$ .** (A) Charakteristischer Western Blot gegen die Calcium-abhängigen PKC-Isoformen  $\alpha$ . (B) Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n \geq 3$  Kulturschalen pro Bedingung.

Auf der anderen Seite führte die  $\alpha_1$ -adrenerge Stimulation mittels Phenylephrin prinzipiell zu einem leicht vermehrten, signifikanten Anteil der PKC-Isoformen  $\delta$  (A) und  $\epsilon$  (B) in der membranären Fraktion adulter Kardiomyozyten. (Abbildung 43A und B). Diese beiden Isoformen stellen Calcium-unabhängige PKC-Isoformen dar (STEINBERG ET AL., 1995).

A



B

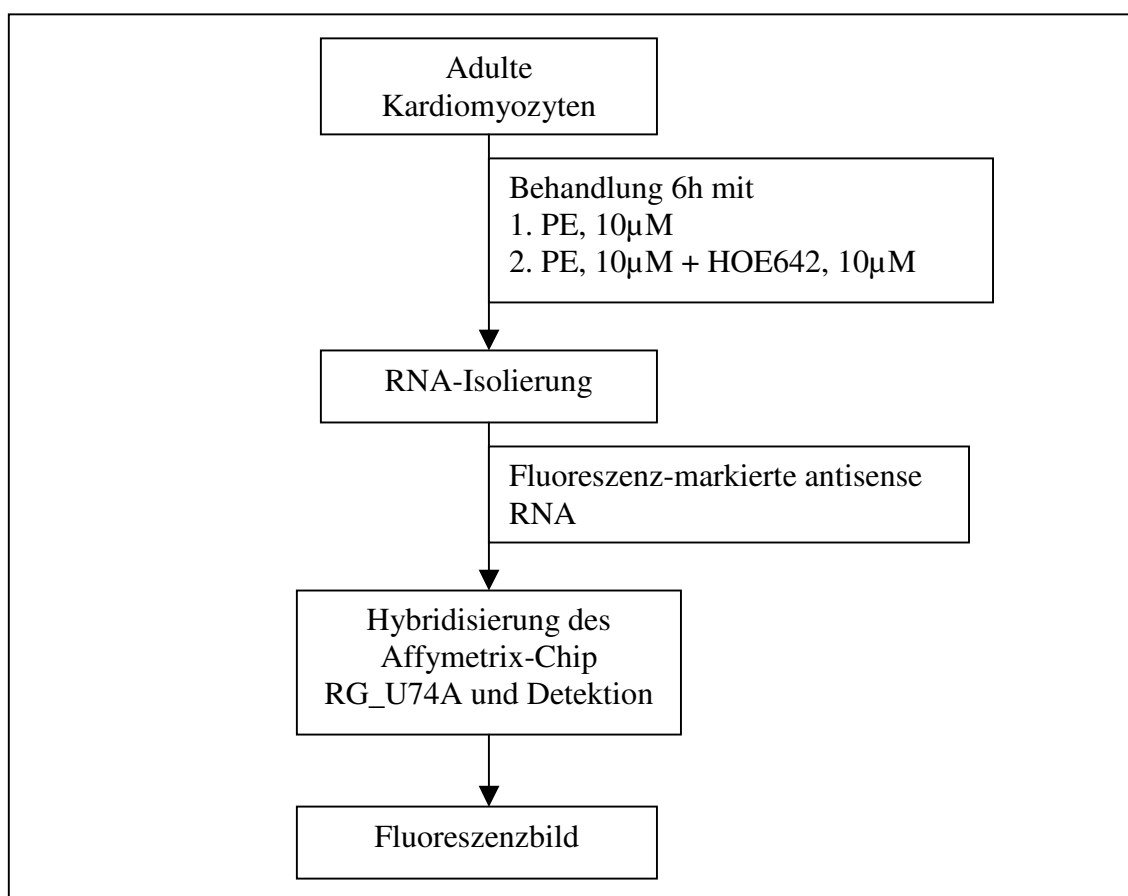


**Abbildung 43: Translokation der Calcium-unabhängigen PKC-Isoformen  $\delta$  und  $\epsilon$ .** (A) und (B): Charakteristischer Western Blot gegen die Calcium-unabhängigen PKC-Isoformen  $\delta$  (A) und  $\epsilon$  (B). (C) und (D) Auswertung der jeweiligen Blots. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n \geq 3$  Kulturschalen pro Bedingung. \* =  $p < 0,05$  vs. Kontrolle, ° =  $p < 0,05$  vs. PE.

Cariporide alleine hatte keinen signifikanten Effekt auf die Translokation dieser PKC-Isoformen. Nach Vorinkubation (15min) mit Cariporide konnte die Migration beider PKC-Isoformen unter allen Stimuli signifikant unterbunden werden (Abbildung 43C und D).

### 3.6 DNA-Microchip-Assay

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation der Genexpression von  $\alpha_1$ -adrenerg stimulierten (Phenylephrin, 10 $\mu$ M) Kardiomyozyten mittels DNA-Microchip-Hybridisierungen untersucht um neue, in der Hypertrophie exprimierte Gene zu identifizieren. Ferner wurde untersucht, inwieweit Cariporide (HOE642, 10 $\mu$ M) die Genexpression dieser Gene moduliert. Die DNA-Microchip-Hybridisierung ließ sich in 2 Teile aufteilen: 1. Biologisches Experiment (Abbildung 44) und 2. Bioinformatische Auswertung (Abbildung 45).

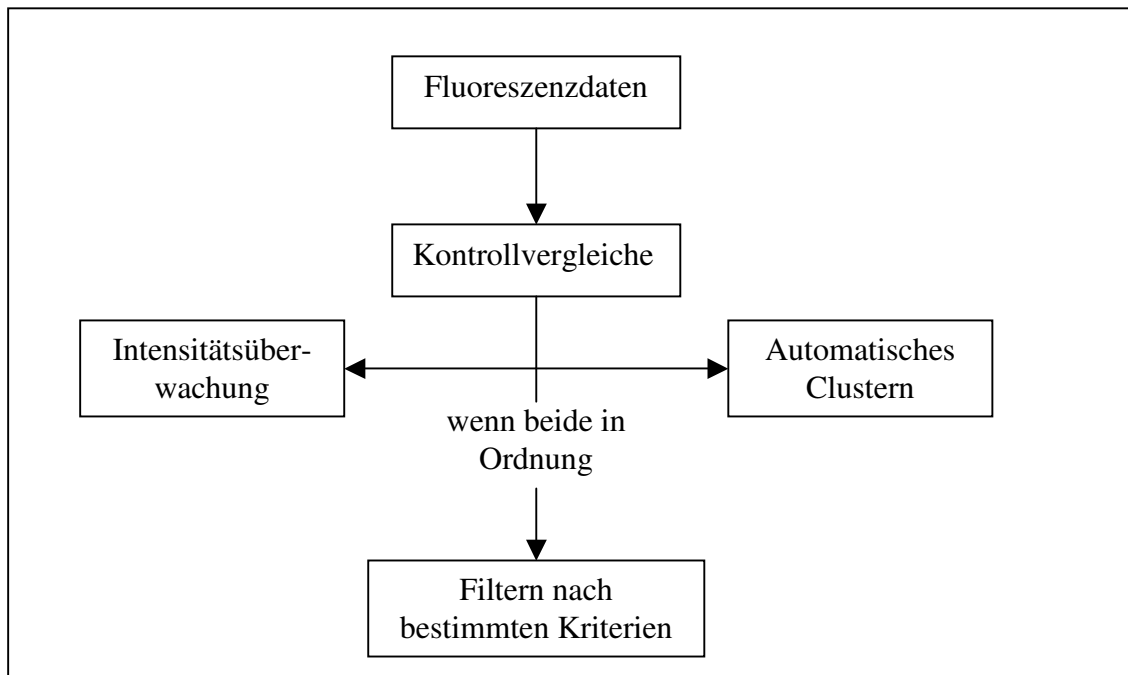


**Abbildung 44: Arbeitsgang einer DNA-Microchip-Hybridisierung.**

Als Ausgangsmaterial für die DNA-Microchip-Hybridisierungen dienten unstimulierte Kardiomyozyten, sowie Zellen, die für 6 Stunden mit 10 $\mu$ M Phenylephrin behandelt, bzw. bereits 15 Minuten vorher zusätzlich mit Cariporide (10 $\mu$ M) vorinkubiert waren. Aus einer großen Kardiomyozyten-Präparation (4 Herzen) wurden je Bedingung Duplikate angefertigt. Nach einer Standardmethode wurde die RNA isoliert (2.10.2) und, wie im Methodenteil nach dem „*standard-one-round amplification protocol*“ beschrieben (siehe Kapitel 2.10.9), auf RG\_U74A-Chips hybridisiert. Die DNA-Microchip-Hybridisierungen wurden von Herrn M.

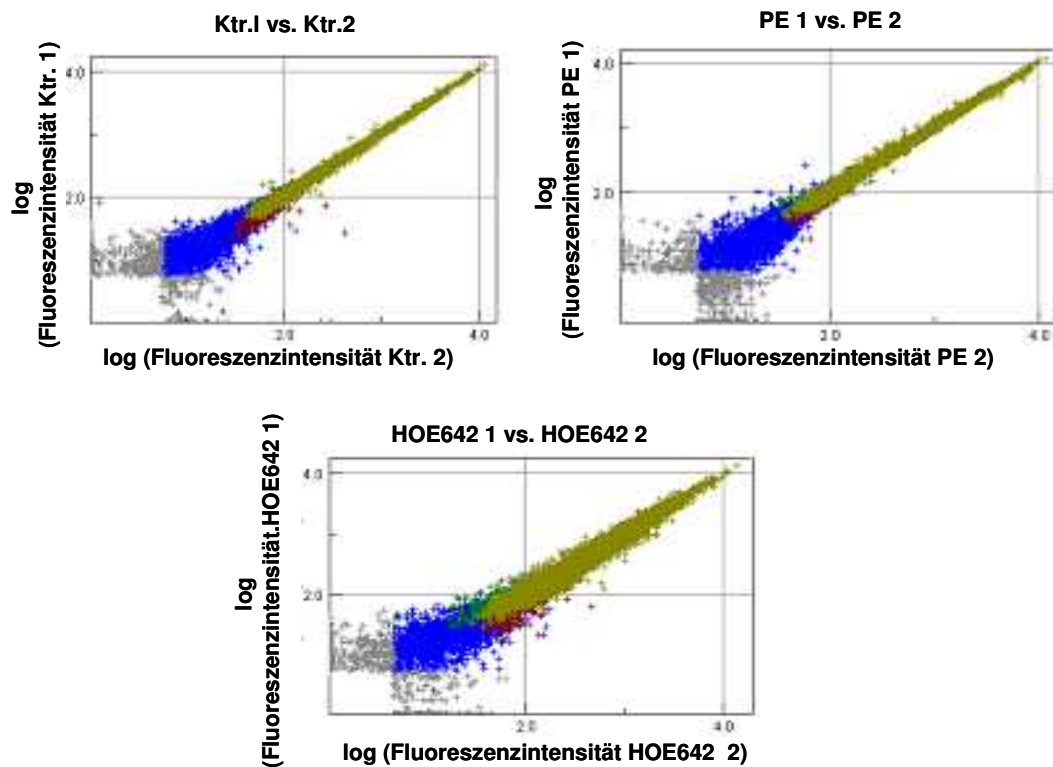


Ozog, Labor Dr. Ivashchenko, Aventis Pharma (Abteilung Herz-Kreislauf), durchgeführt. Diesem praktischen Teil folgte eine detaillierte bioinformatische Auswertung, deren Ablauf in Abbildung 45 grob dargestellt ist.



**Abbildung 45: Typischer Ablauf einer bioinformatischen Auswertung eines Chipexperimentes.**

Im allerersten Schritt wurden die jeweiligen Wiederholungen einer Bedingung, die auf zwei getrennten Chips hybridisiert waren, in ihren Intensitätsdaten miteinander verglichen (Abbildung 46).



**Abbildung 46: Kontrollvergleich der verschiedenen Intensitätsdaten im so genannten Intensitätsdiagramm (im Englischen: „Intensity-Plot“).**

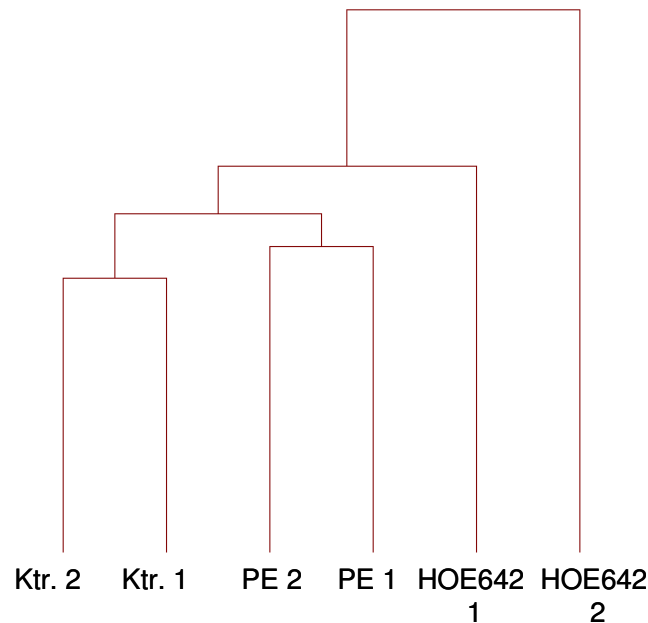
Die hier dargestellten Intensitätsdiagramme verdeutlichen die Unterschiede zwischen Replikaten der jeweiligen Inkubationsbedingung: Ktr. = Kontrollgruppen, PE = Phenylephrin-behandelte Gruppen, HOE642 = Vorinkubation (15min) mit Cariporide, 10 $\mu$ M und anschließendem Zusatz von Phenylephrin.

Bei einer geringen Varianz liegen theoretisch alle detektierten Gene auf einer Ursprungsgeraden, da die Fluoreszenzintensitäten sich dann nicht voneinander unterscheiden. Dargestellt durch grüne Kreuze sind Gene, die in beiden Proben vorkommen und in allen 3 untersuchten Gruppen annähernd auf der Ursprungsgeraden des jeweiligen Diagramms liegen. Rote Kreuze stellen Gene dar, die nur in einer Probe der Replikate vorkommen. Die blauen und grauen Kreuze sind für die Auswertung nicht von besonderer Bedeutung.

Im Falle der hier durchgeführten Experimente wurde eine exzellent niedrige Varianz der Proben untereinander beobachtet. Diese geringe Streuung spricht für eine gute Qualität der Chip-Experimente.

Eine zweite Kontrollmöglichkeit der erhobenen Chip-Daten bestand durch ein automatisches „Cluster-Verfahren“. In diesem Verfahren wurden alle Datensätze ohne vorhergehende Klassenzuordnung nach bestimmten mathematischen Algorithmen (ALON ET AL., 1999; EISEN

ET AL., 1998) mittels des Softwareprogramms Rosetta Resolver 4.0 nach Ähnlichkeit im Expressionsmuster verglichen und sortiert. Das Einsortieren in zu bildende Gruppen oder Cluster geschieht nur unter Berücksichtigung der gemessenen und damit intrinsischen Probeneigenschaften. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt in hierarchisch organisierten Bäumen (Dendrogramme), die die Verwandtschaft oder Ähnlichkeit von Gruppen oder Clustern anschaulich machen. Abbildung 47 zeigt das Ergebnis für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente.



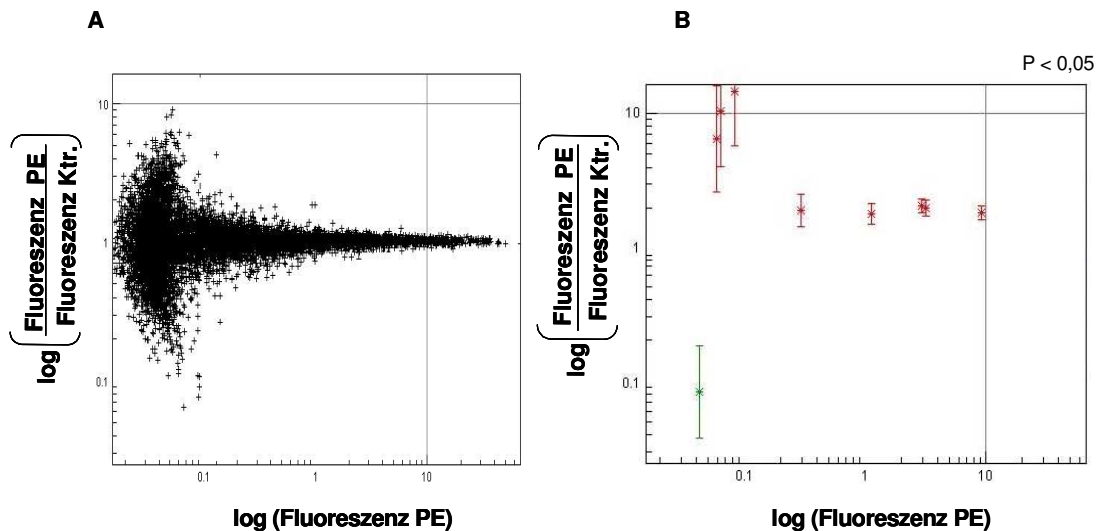
**Abbildung 47: Hierarchisches Clustern der Kontroll-; Cariporide-vorbehandelten sowie Phenylephrin-behandelten Zellen auf den Gen-Chips.**

Es ist klar zu erkennen, dass beide Kontroll- und Phenylephrin-Replikate eine deutliche Ähnlichkeit zueinander aufweisen, was durch die kurzen Äste, mit denen sie untereinander verbunden sind, verdeutlicht wird. Diese beiden Behandlungsgruppen unterscheiden sich aber dennoch deutlich voneinander, da sich die Äste des Diagramms verzweigen. Eine größere Divergenz war zwischen den beiden Cariporide-Replikaten zu erkennen.

Beide Kontrollfunktionen der Chipdaten zeigten eine hohe Qualität der Chipdaten, so dass eine weitere Untersuchung der Chipdaten in Richtung Art und Anzahl der regulierten Gene durchgeführt wurde.

Zunächst wurden die Fluoreszenzintensitäten beider Replikate einer Gruppe gemittelt und anschließend die behandelte Probe zu den nicht behandelten Proben ins Verhältnis gesetzt. Dieses Verhältnis gibt Auskunft über die Anwesen- oder Abwesenheit des entsprechenden

Transkripts auf dem Chip. Abbildung 48A zeigt eine doppellogarithmische Auftragung des Fluoreszenzverhältnisses gegenüber der Intensität des Fluoreszenzsignals der behandelten Probe. Diese Art der Darstellung wird im Englischen als „*Scatter Blot*“ bezeichnet.



**Abbildung 48: Scatter Blot-Darstellungen** Aufgetragen sind die gemittelten Fluoreszenzintensitäten beider Replikate einer Gruppe im Verhältnis zueinander, gegen die gemittelte Fluoreszenzintensität der Phenylephrin-behandelten Gruppe. **(A)** Übersicht aller auf dem Genchip exprimierten Gene. Ca. 8740 Gene sind exprimiert. **(B)** Scatter Blot nach Filteranlegung. 8 rot markierte, bzw. ein grünes Sternchen stehen für veränderte Gene der Chip-Ergebnisse.

Aus dieser ersten Auftragung 48 (A) ist zu entnehmen, dass ca.  $\frac{1}{3}$  der 22.000 möglichen Gene des Chips in der RNA der Rattenkardiomyozyten exprimiert vorlag. Einige dieser Gene sind bis zu 10fach hoch- oder runterreguliert. Um eine statistisch gesicherte Aussage dieser Chip-Ergebnisse machen zu können, wurden weitere Filterkriterien angelegt. Eine Filterauswahl bestand darin, dass nur Gene in Betracht gezogen wurden, die mindestens 1,7-fach hoch- oder runterreguliert vorlagen bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  (Abbildung 48B).

Nach Anlegung dieser Filterkriterien resultierten überraschenderweise insgesamt nur 8 signifikant hochregulierte Gene (rote Sternchen) und nur signifikant 1 runterreguliertes Gen (grünes Sternchen).

Dasselbe Filterverfahren wurde ebenfalls für die Fluoreszenzdaten der aus der Cariporide- und Phenylephrin-Gruppe im Verhältnis zu der Kontrollgruppe angelegt (Daten sind hier nicht gezeigt). Auch hier waren nur einige wenige Gene signifikant reguliert.

In der folgenden Tabelle 2 sind alle in den durchgeführten Experimenten signifikant regulierten Gene aufgeführt.

**Tabelle 2: Genexpressionsmuster der Rattenkardiomyozyten nach Stimulation mit Phenylephrin oder der Kombination aus Phenylephrin und Cariporide (HOE642).**

Zusammenfassung der Top 9 Gene, die signifikant exprimiert werden, incl. Gen-Accession-Code, Genbezeichnung und gemessenem Expressionsunterschied.

<b>Gencode</b>	<b>Genbezeichnung</b>	<b>x-fache Regulation PE vs. Ktr.</b>	<b>x-fache Regulation HOE642/PE vs. Ktr</b>
X64052	AngiotensinII Rezeptorsubtyp 1 (ATR1)	14,1	-
D85183	Protein-Tyrosin Phosphatase Non- Rezeptor Substrat 1 (SHPS-1)	10,2	-
AI137331	Rho Kinase Isoform I (ROCK1)	6,4	-
U75397	Early growth response gene 1 (EGR-1)	2,1	1,8
M18416	Early growth response gene 1	2,0	1,9
AB003726	Homer 1	1,9	2,4
AF023087	Early growth response gene 1	1,8	1,8
AI176662	Early growth response gene 1	1,8	2,0
AF030088	Homer 1	-	7,0
AA924591	Cytochrom P4504A Isoform 3 (Cyp4A3)	- 12,3	- 21,9
Y13714	Osteonectin (SPARC)	-	- 1,7
D82074	Brain helix-loop-helix factor-1 (Neurod1)	-	- 2,0
AB004277	Protocadherin 5	-	- 2,0
EST Anzahl (13)	Expressed Sequence Tags	-	runterreguliert

Insgesamt lässt sich die Tabelle 2 in 3 Bereiche einteilen. Sehr stark hochreguliert in der ausschließlich Phenylephrin-behandelten Gruppe ist der Angiotensin-II-Rezeptorsubtyp 1 (AT<sub>1</sub>R) und das Substrat der Protein-Tyrosin-Phosphatase (SHPS-1) sowie die Rho-Kinase 1 (ROCK1). Alle diese hochregulierten Gene ließen sich unter Vorinkubation mit Cariporide nicht mehr als signifikant reguliert wiederfinden.

Auffallend ist, dass in beiden behandelten Gruppen das *Early growth response Gen-1* 4 Mal als hochreguliert detektiert wird. Dieses Gen ist redundant auf dem Chip vertreten, wobei die Sequenzen zwar Unterschiede aufweisen, aber letztendlich für ein und dasselbe Gen kodieren. Da EGR-1 jedes Mal annähernd gleich stark reguliert detektiert wird, spricht auch dieses Ergebnis für eine besondere Qualität der RNA und der Chip-Ergebnisse.

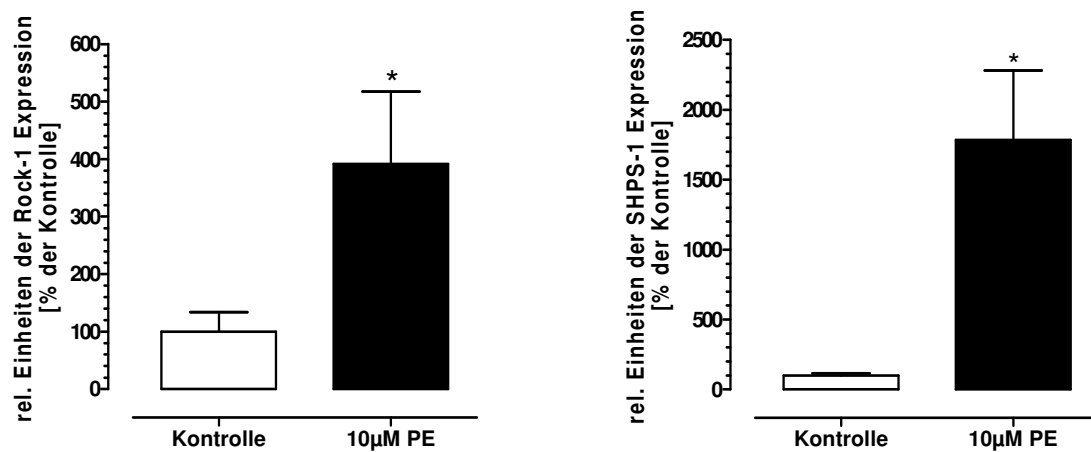
Als besonders stark runterreguliert erwies sich in beiden untersuchten Gruppen die Isoform 3A des Cytochrom P450.

Im Gegensatz zu den Phenylephrin-stimulierten Zellen wurden durch die Vorbehandlung mit Cariporide einige Transkripte detektiert, deren Sequenz zwar bekannt ist, aber deren Zuordnung zu einem Gen oder Protein noch nicht definiert ist (sogenannte EST; SCHULER, 1997).

### **3.7 Verifizierung differenziell regulierter Gene der DNA-Microchip-Experimente**

Um die DNA-Mikrochipdaten zu validieren, wurde die Regulation der gefundenen Gene mittels Echt-Zeit-PCR auf Genregulation und per Western Blotting auf Proteinebene untersucht. Anhand der Echt-Zeit-PCR wurden aus den vorhandenen Chip-Datensätzen 3 ausgewählte Gene bestätigt.

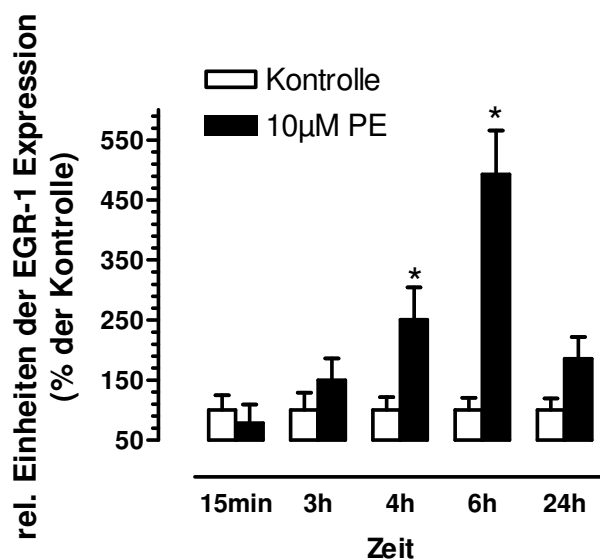
Zu den besonders stark hochregulierten Genen des DNA-Mikrochip-Experimentes gehörten die Rho-Kinase 1 (ROCK1) und das Protein-Tyrosin Phosphatase Non-Rezeptor Substrat 1 (SHPS-1). Für diese beiden Gene ergab sich folgende Validierung der Chipexperimente, nach 6-stündiger  $\alpha_1$ -adrenerger Stimulation, mittels Echt-Zeit-PCR (Abbildung 49):



**Abbildung 49: Expressionsprofil für die ROCK1- (linkes Bild) und SHPS-1-Expression (rechtes Bild) in Rattenkardiomyozyten.** Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n = 3$  Experimenten mit je 3-4 Kulturschalen pro Bedingung. \* =  $p < 0,05$  vs. Kontrollzellen.

Beide Expressionsergebnisse bestätigen signifikant die DNA-Mikrochip-Daten. Für das SHPS-1 Gen kam es nach 6-stündiger Inkubation mit Phenylephrin (PE, 10µM) zu einer 18-fachen Expressionssteigerung, ROCK1 wurde ca. 4-fach stärker exprimiert.

Für das Gen EGR-1 wurde für den Gencode M18416 zusätzlich eine Zeitverlaufskinetik nach  $\alpha_1$ -adrenerger Stimulation mittels Phenylephrin (PE, 10µM) aufgestellt (Abbildung 50).

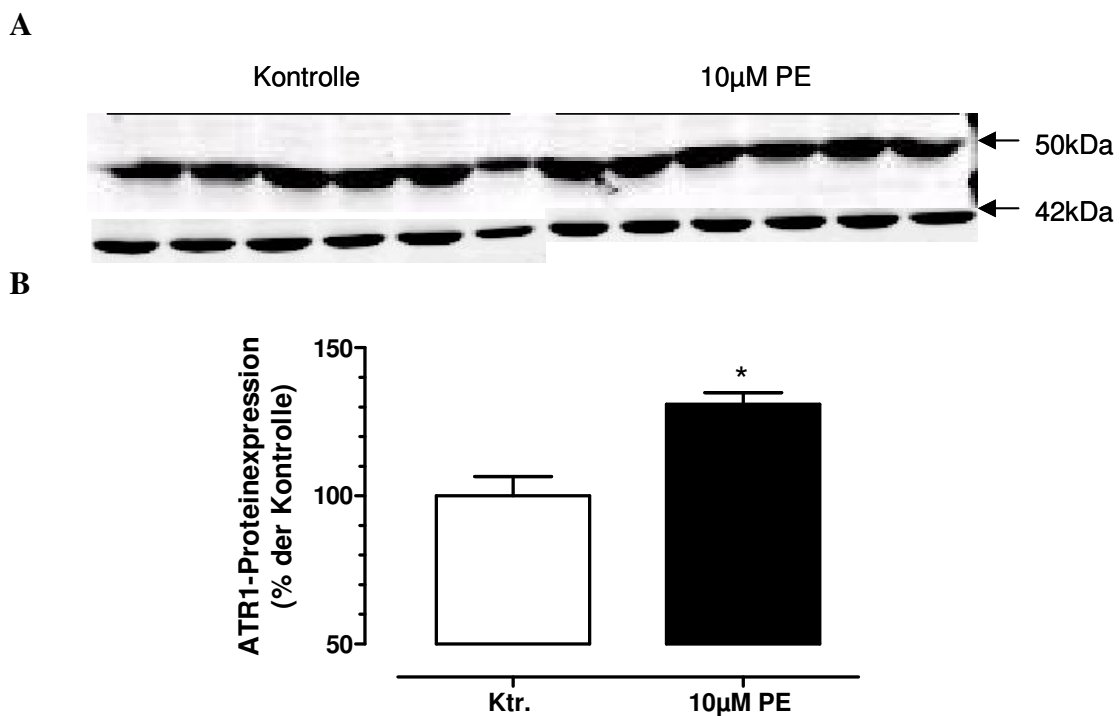


**Abbildung 50: Phenylephrin-induzierte EGR-1 Expression in Abhängigkeit der Zeit.** Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n = 3$  Experimenten mit je 3-4 Kulturschalen pro Bedingung. \* =  $p < 0,05$  vs. Kontrollzellen.

Nach 4-stündiger  $\alpha_1$ -adrenerger Stimulation war EGR-1 bereits signifikant erhöht und erreichte nach 6-stündiger Stimulation ein Maximum. Nach 24-stündiger  $\alpha_1$ -Adrenozeptor Stimulation war die EGR-1-Expression wieder nicht mehr signifikant beeinflusst gegenüber

der Kontrollgruppe. In weiteren Experimenten konnte die maximale Expressionssteigerung für EGR-1 nach 6-stündiger  $\alpha_1$ -adrenerger Stimulation zusätzlich bestätigt werden (Daten sind hier nicht gezeigt).

Für ein weiteres pathophysiologisches Gen, den Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp 1 (ATR1), konnte bisher keine geeignete Echt-Zeit-PCR etabliert werden. Um trotzdem die Chipdaten für diesen Rezeptor-Subtyp bestätigen zu können, wurde die Proteinexpression mittels eines speziellen, kommerziell erhältlichen Antikörpers gemessen (Abbildung 51A und B).



**Abbildung 51: Repräsentativer Western Blot der ATR1-Proteinexpression (50kDa) nach 6-stündiger Stimulation mit Phenylephrin (PE, 10µM).** (A) Repräsentativer Western Blot. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM mit  $n = 6$  Kulturschalen pro Bedingung normalisiert auf die Beladungskontrolle Aktin (42kDa). (B) Auswertung des repräsentativen Western Blots. \* =  $p < 0,05$  vs. Kontrolle.

Nach 6-stündiger Inkubation konnte unter Phenylephrin-Behandlung ein signifikanter 1,3-facher Anstieg der ATR1-Proteinexpression detektiert werden.



## **4 Diskussion**

Die Myokardhypertrophie ist zum größten Teil eine Zunahme der ventrikulären Muskelmasse, die durch eine Volumenzunahme, aber nicht durch Zellteilung der Kardiomyozyten bedingt ist. Diese Volumenzunahme geht einher mit einer Verschiebung der unter physiologischen Bedingungen ausgeglichenen Bilanz von Protein-Neusynthese und -degradation zugunsten der Synthese. Die myokardiale Hypertrophie gilt als starker prognostischer Marker für ein nachfolgendes Erkranken an Herzinsuffizienz.

In verschiedenen experimentellen Herzinsuffizienzmodellen (YOSHIDA ET AL., 2000; CAMILION DE HURTADO., 2002; JANDELEIT-DAHM ET AL., 2000) konnte gezeigt werden, dass der NHE-1 in der Entwicklung der kardialen Hypertrophie involviert bzw. im insuffizienten Myokard hochreguliert ist und somit zum Prozess der Herzinsuffizienz beiträgt (KARMAZYN ET AL., 2001).

Auf diesen bekannten Befunden baut sich die vorliegende Arbeit auf. Ausgangspunkt waren dabei vor allem Ergebnisse, die aus einem transgenen Tiermodell mit kardialer Überexpression des  $\beta_1$ -Adrenorezeptors, dessen Phänotyp eine ausgeprägte myokardiale Hypertrophie und Fibrose aufweist, gewonnen wurden. In der Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Prof. Lohse (Ludwigs-Maximilians-Universität Würzburg) konnte bei 5 Monate alten transgenen Mäusen eine signifikante Hochregulation des NHE-1-Proteins im Herzen gezeigt werden (ENGELHARDT ET AL., 2002). Die Rolle des NHE-1 wurde in diesem Tiermodell durch die Gabe von Cariporide (HOE642), dem ersten bei Aventis entwickelten spezifischen NHE-1-Inhibitor, untersucht. Nach 5-monatiger Behandlung unter Cariporide zeigte sich eine erhebliche Verringerung der Hypertrophie und der interstitiellen Fibrose der linksventrikulären Wand im Vergleich zu nicht behandelten,  $\beta_1$ -transgenen Tieren. Diese Ergebnisse legten nahe, dass der NHE-1 als Mediator der  $\beta_1$ -adrenergen Hypertrophie-Antwort fungiert.

So klar diese Ergebnisse eine Rolle des NHE-1 in der Herzinsuffizienz bestätigten, so unklar war und ist nach wie vor der exakt zu Grunde liegende molekulare Mechanismus. Fragen zur Signaltransduktion bzw. zum Mechanismus einer Wirkung lassen sich in Tiermodellen oft nur unzureichend und schwer adressieren. Im Folgenden wurden dementsprechend anhand eines Zellkulturmodells adulter Kardiomyozyten mögliche Signaltransduktionswege einer NHE-1-

Inhibition auf die Entwicklung einer adrenerg-vermittelten myokardialen Hypertrophie untersucht.

#### **4.1 Relevanz des Modells im Hinblick auf die Fragestellung**

Genereller Vorteil aller Kardiomyozyten-Kulturen gegenüber dem *in vivo* Modell ist, dass alle komplexen, systemischen, hämodynamischen und mechanischen Faktoren vernachlässigt werden können und die direkte lokale Wirkung hypertropher Faktoren bzw. anti-hypertropher Inhibitoren untersucht werden kann. Die gegenwärtigen zellbiologischen Erkenntnisse zur Entstehung einer Myokardzell-Hypertrophie stammen überwiegend aus Untersuchungen an kultivierten neonatalen Kardiomyozyten. Während adulte Kardiomyozyten nicht mehr die Fähigkeiten zur Zellteilung besitzen (SCHWARZFELD & JACOBSON, 1981), reagieren neonatale Kardiomyozyten auf einen Wachstumsstimulus nicht nur mit Hypertrophie, sondern auch mit Zellteilung (KASTEN 1972). Das bedeutet, dass selbst nach der Isolation aus dem Herzen die Anzahl an neonatalen Kardiomyozyten in der sich anschließenden Kultivierungsphase noch zunimmt und damit größere Zellzahlen für zellbiologische Untersuchungen relativ einfach zu erreichen sind. Bei adulten Kardiomyozyten nimmt dagegen die Zellzahl in Kultivierung mehr oder weniger schnell und kontinuierlich ab. Auf der anderen Seite ist die fehlende Proliferation in adulten Kardiomyozyten von großem Vorteil, da entsprechende Signaltransduktionen abgeschaltet sind und sehr viel stärker kardial-spezifische differenzierte Signale ausgebildet sein könnten. In der Quintessenz stellen neonatale Kardiomyozyten zwar ein Modell mit recht einfachem Zugang dar, aber mit einer in Bezug auf Hypertrophie-Vorgänge wahrscheinlich höheren Anzahl an falsch positiven Befunden, da sie zudem zu einem beträchtlichen Anteil mit nichtmyozytären Zelltypen durchsetzt. (LONG ET AL., 1993) sind.

Da die Myokardhypertrophie klinisch vor allem im Erwachsenenalter relevant wird, werden adulte Kardiomyozyten gerade im Hinblick auf die geringere Anzahl von Falschaussagen bevorzugt. Nachteile dieses Modells sind fehlende parakrine Mechanismen und ein größerer Aufwand zur Isolierung einer ausreichenden Anzahl von Myokardzellen. Es sollte ebenfalls bedacht werden, dass die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten aus isolierten Kardiomyozyten stammen. Generell spielt die Hypertrophie eine Rolle im gesamten Herzen, sprich im Verbund von Zellen. Um dieses gesamte Phänomen der Hypertrophie zu berücksichtigen, werden von entsprechenden Arbeitsgruppen in der Regel *in vivo* Versuche mit transgenen oder „knockout“ Tieren nachgeschaltet.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein zuverlässiges *in vitro* Modell gewählt, das in der Lage ist, relevante und valide Aussagen in Bezug auf Hypertrophie-Messungen zu liefern. Das Modellsystem der adulten Kardiomyozyten wurde anhand des radioaktivmarkierten Einbaus von  $^{14}\text{C}$ -Uridin und  $^{14}\text{C}$ -Phenylalanin, sowie Hypertrophie-spezifischen Biomarkern („brain natriuretic peptide“, BNP, MAIR ET AL., 2001; HAMMERER-LERCHER ET AL., 2004; „fötale“  $\beta$ -Isoform in der schweren Kette des Myosins;  $\beta$ -MHC; CARVALLO ET AL., 2003) validiert.

#### **4.2 Einfluss von Cariporide auf die untersuchten Hypertrophie-Parameter**

Ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit ist die Beobachtung, dass der NHE-1 Inhibitor Cariporide im Modellsystem der adulten Kardiomyozyten alle für die Hypertrophie relevanten zellulären Parameter, wie Zellvolumenzunahme, gesteigerte RNA- und Protein-Neusynthese, wieder auf das Kontrollniveau absenkt. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Publikationen (SCHLÜTER ET AL., 1998(A); SCHÄFER ET AL., 2002), in denen die Autoren eine Inhibition der Protein-Neusyntheserate mit einem NHE-1 Inhibitor der ersten Generation (HOE-694) beschreiben konnten.

Die überwiegende Anzahl an Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit zur NHE-1-Inhibition wurden im Kardiomyozyten-Modell anhand einer  $\alpha_1$ -adrenerge Hypertrophie-Induktion erhalten, während die ersten eigenen Wirkdaten zu NHE-1 aus  $\beta_1$ -transgenen Tiere stammten. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine  $\beta_1$ -spezifische Induktion in adulten Kardiomyozyten, wie bereits bei SCHÄFER ET AL (2000) beschrieben, zu einer Hypertrophie führt und diese dann durch NHE-1-Inhibition signifikant reduziert wurde. Der generellen Verwendung der in adulter Kardiomyozytenkultur stärkeren  $\alpha_1$ -adrenergen Stimulation mittels Phenylephrin an Stelle einer  $\beta_1$ -adrenergen Stimulation lag jedoch ein besonderer Zusammenhang zu Grunde, der von SCHÄFER ET AL. (2001) erst in letzter Zeit deutlich aufgezeigt wurde. Demnach führt eine selektive  $\beta_1$ -adrenerge Stimulation zwar zu einer Hypertrophie in Kardiomyozyten, „bremst“, d.h. unterdrückt jedoch gleichzeitig über einen Proteinkinase-A-abhängigen Mechanismus die  $\alpha_1$ -adrenerge Hypertrophie-Entwicklung im gleichen Modell. Solange die  $\beta_1$ -adrenerge Signaltransduktion im Kardiomyozyt erhalten bleibt, werden entsprechende  $\alpha_1$ -adrenerge Stimulationen schwächer ausfallen. Gerade für die Hypertrophie und die Herzinsuffizienz liegen jedoch mittlerweile starke Evidenzen vor, dass die  $\beta_1$ -adrenerge Signaltransduktion mit fortschreitendem Verlauf stark desensibilisiert wird (LOHSE, 1992; BRODDE, 1993). Auch im Modell der  $\beta_1$ -transgenen Maus gibt es

entsprechende Hinweise (STEINBERG, 1999): Einem initialen, transienten Anstieg der kardialen Funktionen folgt bei progressiver, kardialer Verschlechterung im zunehmenden Alter der transgenen Tiere nicht nur die Ausbildung einer Hypertrophie. Vielmehr nimmt die kardiale Kontraktilität trotz Blockade der  $\beta$ -Rezeptoren mit Propanolol ab (ENGELHARDT ET AL., 1999). Mit steigender Desensibilisierung der  $\beta_1$ -adrenergen Kaskade im Patienten und im Tiermodell entfällt jedoch zunehmend auch die „bremsende“ Wirkung auf die  $\alpha_1$ -adrenerge Signaltransduktion, so dass diese zum eigentlichen Hypertrophie-induzierenden Stimulus wird. Aus diesen Erkenntnissen heraus wurde in der vorliegenden Arbeit der  $\alpha_1$ -adrenerge Stimulus als genereller hypertropher Stimulus gewählt. Trotzdem führten auch alle anderen in der vorliegenden Arbeit getesteten Hypertrophie-Stimuli zu einem signifikanten Anstieg der gemessenen Hypertrophie-Parameter, die durch Cariporide in all diesen Fällen signifikant unterbunden werden konnten.

Eine interessante Frage ist, ob die beobachtete Hemmung der  $\alpha_1$ -adrenerg induzierten Zellvolumenzunahme auch durch schnelle osmotische Effekte über Änderungen in der Ionen-Homeostase zu Stande kommt. Solche osmotisch bedingten Effekte von NHE-1-Inhibitoren wurden für andere Zelltypen, wie z.B. Hepatozyten, beschrieben (VOLKL ET AL., 1994). Kardiomyozyten scheinen diesbezüglich zellbiologisch divergent zu sein. Nach gängigem Verständnis wachsen diese Zellen unter Hypertrophie aus sich selbst heraus, d.h. diese Zellen bilden vermehrt intrazellulär kontraktile Strukturen bzw. die dafür notwendigen Proteine (SCHLÜTER & PIPER., 1999). Erst als Folge dieser intrazellulären Expansion resultiert dann im zweiten Schritt eine über Stunden stetig ansteigende Volumenzunahme. Mit letztendlicher Gewissheit lassen sich osmotische Effekte als Primärmechanismus bei der Wirkung von Cariporide auf Kardiomyozyten jedoch nicht ausschließen.

Wie durch den Einsatz mehrerer, aus dem laufenden Programm der Aventis Herz-Kreislauf-Forschung stammender NHE-1-Inhibitoren gezeigt werden konnte (Tabelle 3), ist der Hypertrophie-hemmende Effekt von Cariporide klassenspezifisch.

**Tabelle 3: Vergleich verschiedener NHE-1-Inhibitoren hinsichtlich ihrer Hemmwirkung auf die Hypertrophie an adulten Rattenkardiomyozyten bzw. ihrer NHE-1 Inhibition am humanen rekombinanten NHE-1.**

NHE-1-Inhibitor	Vollständige Hypertrophie-Inhibition bei	IC <sub>50</sub> für Hemmung des humanen NHE-1 <sup>*)</sup>
Cariporide (HOE642)	10µM	0,033µM
S4890	0,1µM	0,001µM
S4306	0,1µM	0,005µM
S6994	0,1µM	0,002µM

<sup>\*)</sup> gemessen über intrazelluläre pH-Messungen an einer rekombinanten Fibroblastenzelllinie.

Wie diese Tabelle aufzeigt, ist die zur vollständigen Hypertrophie-Hemmung notwendige Konzentration des Inhibitors umso geringer, je potenter die Substanz den humanen NHE-1 hemmt. Auffallend ist die Diskrepanz in der Dimension zwischen beiden Parametern. So lagen alle genutzten Konzentrationen zur vollständigen Hypertrophie-Hemmung ca. 100fach über dem jeweiligen IC<sub>50</sub>-Wert. Ursache hierfür könnte neben einem reinen Speziesunterschied – die reinen IC<sub>50</sub>-Werte am Ratten-NHE-1-Subtyp wurden bisher noch nicht ermittelt – auch eine zur endgültigen Hypertrophie-Hemmung notwendige vollständige Sättigung aller NHE-1-Moleküle sein. Die für die vollständige Hypertrophie-Inhibition benötigte höhere Konzentration könnte jedoch auch auf die chemische Instabilität der sogenannten Benzoylguanidine zurückgeführt werden. Die Aminoguanidin-Nebengruppe ist für die NHE-1-hemmende Wirkung in diesem Molekül essentiell, unterliegt bei dem physiologischen pH-Wert jedoch leichter der Hydrolyse. Im Rahmen des 24-stündigen Inkubationszeitraums der Hypertrophie-Messung könnte daher aufgrund hydrolytischer Vorgänge die reale Konzentration der Inhibitoren deutlich unterhalb der initialen Ausgangskonzentration liegen. Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen *in vitro* Daten zur Hypertrophie-Hemmung müssen mit *in vivo* Daten nicht unbedingt übereinstimmen, da *in vivo* diverse zellübergreifende Vorgänge parallel ablaufen, die eine geringere Dosierung ermöglichen könnten.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Inhibition des NHE-1 mittels spezifischer NHE-1-Inhibitoren antihypertroph wirkt. Diese Erkenntnis kann aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Daten als Klasseneffekt bezeichnet werden. Zudem hat sich die

Hypertrophie-Induktion in adulten Rattenkardiomyozyten als zuverlässiges Sekundärmodell in der Testung neuer NHE-1 Inhibitoren erwiesen.

#### **4.3 Untersuchungen zum Wirkmechanismus von NHE-1-Inhibitoren in der Kardiomyozyten-Hypertrophie**

Aufgrund ihrer Bedeutung als Vorstufe der Herzinsuffizienz ist die myokardiale Hypertrophie seit Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Die vielfältigen Anstrengungen, die zur Aufklärung der mechanistischen Entstehung einer Hypertrophie unternommen wurden, waren insofern von Erfolg, da sehr viele verschiedene Signaltransduktionswege identifiziert wurden, über die an der Induktion und Entwicklung einer Hypertrophie beteiligt sein könnten. Ein alleiniger Schlüsselmechanismus konnte dabei bisher nicht identifiziert werden, die Pathogenese scheint multifaktoriell bedingt zu sein.

Die zunehmenden Erkenntnisse lassen es jedoch möglich erscheinen, dass NHE-1 nicht nur ein Mitspieler im Konzert der verschiedenen Signaltransduktionsmechanismen ist, sondern eine tragende Rolle bei der Pathogenese spielt. Als Ausgangspunkt der Untersuchungen zum Wirkmechanismus von NHE-1-Inhibitoren wurde deren Interaktion mit bestimmten Kinasen untersucht, die einerseits im Zusammenhang mit einer Hypertrophie-Entwicklung in der Literatur bereits genannt wurden, andererseits in der Lage sind, den NHE-1 zu phosphorylieren und damit mit dem „Zielprotein“ zu interagieren.

In der intrazellulären, regulatorischen Domäne des NHE-1-Proteins findet sich eine Vielzahl von Phosphorylierungsstellen (WAKABAYASHI ET AL. 1992). Tatsächlich konnte in nicht-myozytären Zellen gezeigt werden, dass die Aktivierung diverser Signaltransduktionsmechanismen einen Anstieg in der NHE-1-Phosphorylierung hervorrufen, welcher einhergeht mit einer gesteigerten NHE-1-Aktivität (SARDET ET AL., 1989; 1991). Die Liste möglicher NHE-1-aktivierender Kinasen schließen die „*extracellularly signal regulated kinase*“ (ERK; WANG ET AL., 1997), die „90kDa ribosomale S6 Kinase“ (p90<sup>RSK</sup>; TAKAHASHI ET AL., 1999), die 160kDa Rho-assoziierte Kinase (ROCK1; TOMINAGA ET AL., 1998) sowie verschiedene PKC-Isoformen mit ein (SNABAITIS ET AL., 2000).

MOOR & FLIEGEL identifizierten 1999 in neonatalen Rattenkardiomyozyten ERK und p90<sup>RSK</sup> als relevante Kinasen, die nach einer Endothelin-1-Stimulation in vitro die regulatorische Domäne des NHE-1 phosphorylieren konnten. p90<sup>RSK</sup> wird dabei zusätzlich durch eine ERK-

vermittelte Phosphorylierung reguliert (SMITH ET AL., 1999). SNABAITIS ET AL zeigten 2002, dass der ERK/ p90<sup>RSK</sup> Signaltransduktionsweg auch eine wichtige Rolle in der Regulierung der sarcolemmalen NHE-1-Aktivität in adulten Kardiomyozyten spielt. Für beide Forschergruppen stand lediglich die Aktivierung des NHE-1 im Vordergrund und nicht die Rolle in der myokardialen Hypertrophie.

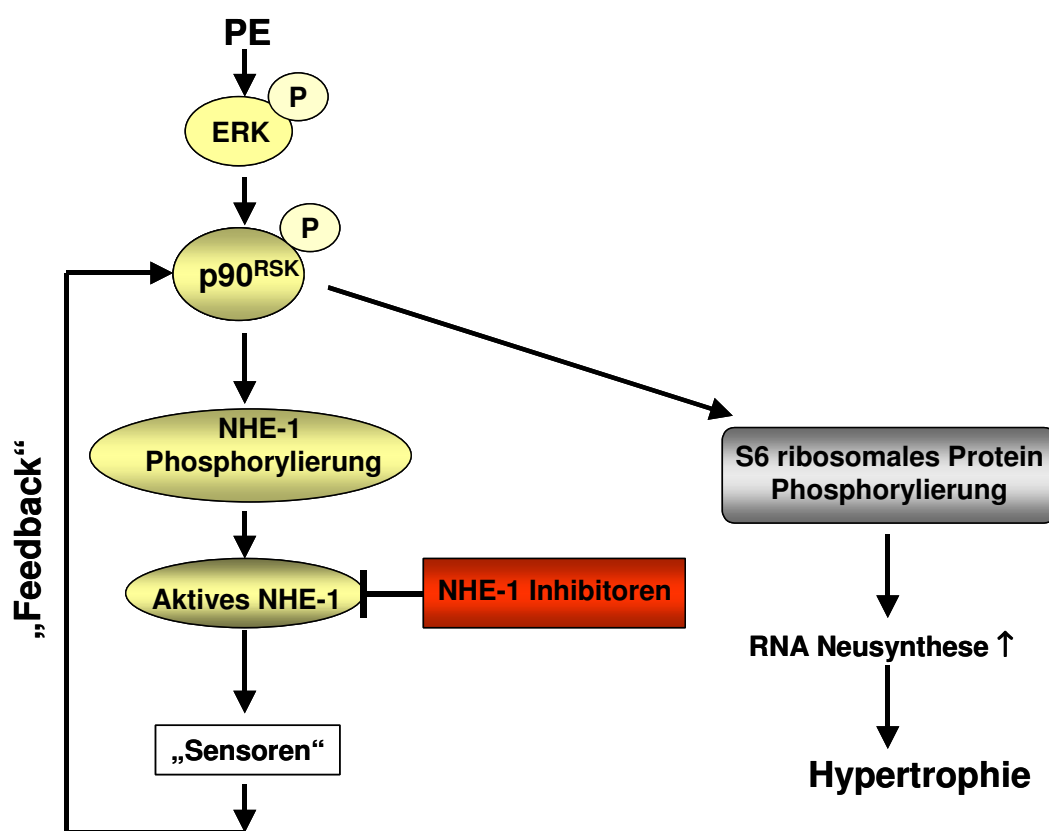
Die Literaturdaten zur Rolle der ERK in der Hypertrophie-Entwicklung sind nach wie vor kontrovers. WANG & PROUD zeigten 2002, dass die ERK nach Aktivierung durch Phenylephrin die Protein-Neusynthese in adulten Rattenkardiomyozyten aktivieren kann. Die Forscher standen damit in Widerspruch zu Ergebnissen von SCHLÜTER ET AL. (1999), nach denen die spezifische Hemmung des ERK-Signaltransduktionsweges zwar die  $\alpha_1$ -adrenerge Induktion des fetalen Kreatinkinase BB-Isoenzym (CK BB-Isoenzym), einem weiteren Markergen myokardialer Hypertrophie, nicht aber die Protein-Neusynthese selbst unterdrückt. Dieses Ergebnis konnte 2002 ebenfalls durch RUF ET AL. bestätigt werden.

Eigene Experimente mit dem bereits 1999 von SCHLÜTER ET AL eingesetzten MEK1-Inhibitor PD98059 unterstützen die Theorie einer untergeordneten Rolle der ERK in der Hypertrophie. PD98059 hemmt die Aktivierung der sogenannten „mitogen activated ERK activating kinase“ (MEK-1). Da diese wiederum spezifisch zwar ERK, nicht aber andere Unterfamilien der MAPK, wie p38 oder JNKs („c-Jun N-terminal kinases“), phosphoryliert, wird durch den Einsatz von PD98059 ausschließlich die nachgeschaltete Phosphorylierung der ERK vollständig gehemmt. Allerdings hatte die komplette Inhibition der ERK-Phosphorylierung durch PD98059 keinen Einfluss auf die  $\alpha_1$ -adrenerg gesteigerte Proteinsyntheserate (Abbildung 37), wie es auch schon 1999 bei SCHLÜTER ET AL beschrieben wurde. Die  $\alpha_1$ -adrenerg induzierte Proteinsynthese wird demnach in adulten Kardiomyozyten nicht über ERK vermittelt.

Kürzlich konnte in neonatalen Rattenkardiomyozyten mittels Phenylephrin gezeigt werden, dass auch die von ERK phosphorylierte p90<sup>RSK</sup> einen hypertrophen Effekt ausübt (SIDDIQUI ET AL., 2004). Die p90<sup>RSK</sup> phosphoryliert neben dem NHE-1 auch das ribosomale S6 Protein, einem wichtigen Bestandteil des zellulären Translationsapparates (PRICE ET AL., 1992). In deren Folge werden zuerst sogenannte „5'-terminal oligopyrimidine tract mRNA's“ (5' TOP mRNA's) gebildet, welche für weitere ribosomale Proteine und Translations-Elongationsfaktoren codieren (ERIKSON, 1991; JEFFERIES ET AL., 1994). Insgesamt wird dadurch die Translationskapazität merklich erhöht. Die Stimulation mit Phenylephrin führte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls zu einer verstärkten Translationskapazität der

Kardiomyozyten, gemessen über den Einbau von radioaktiv markiertem Uridin (Abbildung 22). Im Einklang damit steht die in separaten Experimenten gemessene  $\alpha_1$ -adrenerg bedingte transiente Phosphorylierung der ERK, p90<sup>RSK</sup> und des ribosomalen S6-Proteins.

Unerwartet war jedoch das Ergebnis, dass die NHE-1-Inhibition die Phosphorylierung dieser Kinasen nicht nur nicht hemmte, wie im Fall des ribosomalen S6 Proteins, sondern bei den NHE-1-aktivierenden Kinasen auch über einen längeren Zeitraum noch verstärkte (Abbildung 36 und 38). Eine Erklärungsmöglichkeit für diesen verstärkenden Effekt könnten mögliche Rückkopplungsmechanismen („Feedback“) vom NHE-1 auf die NHE-1-aktivierende Kinase sein (Abbildung 52).



**Abbildung 52: Schematische Darstellung für eine verstärkte Phosphorylierung der p90<sup>RSK</sup> in adulten Rattenkardiomyozyten.**

Solche Rückkopplungsmechanismen sind literaturbekannt und für andere Zielproteine beschrieben. Als Beispiel sei hier kurz auf die Inhibition des „Angiotensin-Converting Enzymes“ (ACE) eingegangen. Wird ACE kompetitiv mit einem ACE-Hemmer wie Captopril blockiert, werden in relativ kurzer Zeit in der Zelle größere Mengen an Angiotensin I gemessen, welche aus einer vermehrten Renin-Freisetzung als „Feedback“-Reaktion der Zelle auf die ACE-Inhibition freigesetzt wurden (MENARD ET AL., 1991, JOHNSON, 2000). Die Zelle versucht somit, einer vermeintlichen Blutdrucksenkung durch zu geringe Angiotensin



II-Konzentrationen, die aus der Spaltung des Angiotensin I durch das ACE im Körper entstehen, entgegen zu wirken.

Auf das vorliegende Ergebnis dieser Arbeit übertragen, ergibt sich folgende Hypothese: Bedingt durch die  $\alpha_1$ -adrenerge Stimulation kommt es zur Phosphorylierung der  $p90^{\text{RSK}}$ . In Abwesenheit eines NHE-1-Inhibitors trägt die  $p90^{\text{RSK}}$  zum Fortschritt der Hypertrophie-Entwicklung sowohl über die Phosphorylierung des NHE-1 als auch über die Phosphorylierung des S6 ribosomalen Proteins bei. Kommt es zur Inhibition des NHE-1, führt eine „Feedback“ Reaktion über mögliche noch nicht genauer bekannte „Sensoren“, die wiederum die NHE-1-aktivierende Kinasen durch Phosphorylierung zu aktivieren. Das ursprünglich vorgesehene Gleichgewicht zwischen phosphorylierter Kinase zu dephosphorylierter wird in diesem Fall durch die Anwesenheit eines NHE-1-Inhibitors zugunsten des phosphorylierten Zustandes verschoben. Möglich ist also, dass sogenannte Rückkopplungsmechanismen von der Zelle initialisiert werden, damit in diesem Fall der NHE-1 über eine phosphorylierte  $p90^{\text{RSK}}$  wieder aktiviert wird. Es ist durchaus nicht auszuschließen, dass eine phosphorylierte  $p90^{\text{RSK}}$  auch andere, z.B. anti-hypertrophe Kinasen, die bisher noch nicht erforscht wurden, phosphoryliert und somit über einen anderen Wirkmechanismus zur Hypertrophie-hemmenden Wirkung von NHE-1-Hemmern beiträgt.

Eine Erklärung für die Normalisierung der Translationskapazität auf Kontrollwertniveau nach NHE-1-Inhibition, ohne den dafür eigentlich wichtigen Schlüsselschritt der Phosphorylierung des ribosomalen S6 Proteins zu hemmen, steht allerdings aus. Möglicherweise gibt es auch innerhalb der Translationsmaschinerie weitere regulierende Elemente des ribosomalen S6 Proteins, dessen Hemmung durch einen NHE-1-Inhibitor dann zu einer Verringerung der zellulären Translationskapazität führt.

Die Protein Kinase C (PKC) scheint ebenfalls eine kritische Rolle bei der Stimulierung der sacrolemmalen NHE-1-Aktivität durch  $\alpha_1$ -adrenerge Stimulation zu spielen. In der vorliegenden Arbeit konnte die Expression von vier Isoformen in Kardiomyozyten aus früheren Berichten bestätigt werden (BOGOYEVITCH ET AL., 1993). Demnach exprimieren adulte Rattenkardiomyozyten die Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta\text{II}$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$  der PKC. Die in dieser Arbeit angefertigten Versuche befassten sich im folgenden nicht mit der Phosphorylierung, sondern mit der Translokation der PKC-Isoformen vom Zytosol zur Membran, die ein Maß für deren Aktivierung darstellt (ARMSTRONG., 2004). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Isoformen  $\alpha$  und  $\beta\text{II}$  konnten nicht mit dem  $\alpha_1$ -adrenergen Stimulus Phenylephrin aktiviert werden (Abbildung 41). Dieses Ergebnis bestätigen ältere Studien an neonatalen Kardiomyozyten (CLERK ET AL.,

1994; PUCEAT ET AL., 1994). HAYASAKI-KAJIWARA ET AL. (1999) zeigten anhand neonataler Kardiomyozyten, dass es unter  $\alpha_1$ -adrenerger Stimulation zur Translokation der Calcium-unabhängigen PKC-Isoformen  $\delta$  und  $\epsilon$  kommt. In dieser Arbeit wurde eine Translokation dieser Isoenzyme durch einen NHE-1-Inhibitor der ersten Generation, HOE694, der die Hypertrophie zwar nur teilweise inhibiert, beobachtet. Somit war eine erste Verbindung zwischen NHE-1-Aktivität und PKC-Translokation hergestellt werden. WANG ET AL. berichteten 2003 über einen Zusammenhang zwischen der Translokation dieser PKC-Isoformen ( $\delta$  und  $\epsilon$ ) und einer Hypertrophie-Entwicklung in adulten Rattenkardiomyozyten. Von besonderer Interesse in diesem Zusammenhang ist die Beobachtung, dass in der vorliegenden Arbeit unabhängig von der PKC-Isoform die aktivierende Translokation dieser Kinasen vom Zytosol an die Membran durch NHE-1-Inhibitoren nahezu komplett in den adulten Rattenkardiomyozyten abgeschwächt war (Abbildung 42 und 43).

Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die NHE-1-Inhibition in die Dynamik von intrazellulären Translokationen allgemein eingreift und diese minimiert. Erkenntnisse mit anderen Zelltypen weisen in solch eine Richtung: So zeigen unter NHE-1-Inhibition Endothelzellen (BUSSOLINO ET AL., 1989) und Epithelzellen (KLEIN ET AL., 2000) sowie Fibroblasten (DENKER & BARBER, 2002) eine deutlich abgeschwächte Tendenz zur intrazellulären Translokation auf. Diesen Ergebnissen ist gemein, dass unter NHE-1-Inhibition sehr wahrscheinlich zytoskellär vermittelte intrazelluläre Translokationprozesse vermindert sind. Von besonderer Bedeutung sind in dieser Hinsicht die Ergebnisse von PUTNEY ET AL. (2002), die herausfanden, dass das NHE-1-Austauscherprotein durch eine Kopplung von Aktin-bindenden Proteinen der ERM- („*Ezrin*, *Radixin*, *Moesin*“) Familie direkt mit Aktinfilamenten innerhalb der Zelle verbunden ist. Der NHE-1 ist demnach in der Membran nicht nur ein Ionenaustauscher, sondern auch ein Ankerprotein innerhalb des Zytoskellets.

In Kardiomyozyten bedarf diese interessante neuartige Hypothese des NHE-1-Wirkmechanismus über zytoskellatabhängige Modulation intrazellulärer Signaltransduktion weiterer bestätigender Experimente. Denkbar wären u.a. fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zu den Veränderungen der intrazellulären Translokation verschiedener Kinasen. Diese müssten aber mit konfokaler Mikroskopie durchgeführt werden, da adulte Kardiomyozyten mit ihrer fast zylindrischen Form herkömmlicher Fluoreszenzmikroskopie nicht zugänglich sind. Überlegenswert wären auch z.B. Immunpräzipitationsexperimente zur Untersuchung der Interaktionen des NHE-1 unter NHE-1-Inhibition mit verschiedenen

intrazellulären Signalproteinen. Diese könnten aber erst erfolgreich nach der Entwicklung hochaffiner Antikörper gegen die Ratten-NHE-1-Isoform durchgeführt werden.

Bei der Frage des möglichen Wirkmechanismus von NHE-1-Inhibitoren wird oft eine „gekoppelte Austauscher-Theorie“ in die Diskussion eingebracht (KARMAZYN, 1996). Demnach kommt es, z.B. im Zuge einer Ischämie, als Folge des anaeroben Metabolismus sowohl intrazellulär als auch extrazellulär zu einem pH-Abfall. Der niedrige intrazelluläre pH führt zu einer schnellen Aktivierung des NHE-1, welcher daraufhin  $H^+$ -Ionen aus der Zelle heraus- und dafür  $Na^+$ -Ionen in die Zelle hineinschleust. Diese intrazelluläre Natriumakkumulation, wie auch die während einer Ischämie reduzierte Fähigkeit der Zelle, Natriumionen herauszutransportieren (KARMAZYN ET AL., 2001), führt dann zur reversen Aktivierung des  $Na^+/Ca^{2+}$ -Austauschers (NCX), der die akkumulierten Natriumionen gegen Calciumionen elektrogen austauscht. Dieser Austausch ist verbunden mit einem Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration (SIFPERT & AKKERMAN, 1989). Die Konsequenzen dieser Calciumüberladung können z.B. neben einer Hypertrophie, Arrhythmien, Hyperkontraktilität und Apoptose sein. Die Wirkung von Cariporide bestünde dann in der Verhinderung der durch Ischämie entstehenden Natrium-Überladung der Zelle, die letztendlich zu einer konsekutiven Calcium-Überladung intrazellulär führt.

Im Herzen bzw. Herzmuskelzellen wird ausschließlich die NCX-1 Isoform exprimiert (NICHOLAS & PHILIPSON, 1999). Für diesen Subtyp steht seit kurzem ein potenter Inhibitor, SEA0400, zur Verfügung, der gegenüber Vorläufermolekülen deutlich spezifischer nur den NCX nicht aber andere bekannte Calciumkanäle und Transporter im Herzen hemmt (MATSUDA ET AL., 2001). Im Gegensatz zu allen NHE-1-Inhibitoren zeigte SEA0400 in keinem der untersuchten zellulären Parameter trotz relevant gewählter Konzentration von  $1\mu M$ , eine inhibierende Wirkung auf die  $\alpha_1$ -adrenerg-vermittelte Hypertrophie. Während das Zellvolumen nicht reduziert wurde (Abbildung 29), konnte bei der RNA- und Protein-Neusynthese sogar eine leichte Steigerung der Werte beobachtet werden (Abbildung 30 und 31).

Es ist daher anzunehmen, dass die Hypertrophie in diesem Zellkulturmodell unter den gegebenen Bedingungen nicht über eine Kopplung des NCX-1 an den NHE-1 auftritt, bzw. dass vom NCX-1 unabhängige Wirkmechanismen auftreten. Einschränkend sollte jedoch bedacht werden, dass mit einer Konzentration von  $1\mu M$  SEA0400 ( $IC_{50}$ -Wert:  $0,03 - 0,04\mu M$ ) 99% des NCX-1 inhibiert werden. Ob eine Residualaktivität von 1% NCX-Aktivität

vollständige Hypertrophie aufwarten können, gilt es zu klären. Hilfreich könnten hier sicherlich Hypertrophie-Untersuchungen in NCX-Knockout-Tieren sein. Diese sind jedoch bis jetzt noch nicht publiziert bzw. stehen nicht zur Verfügung.

#### **4.4 Wirkung der NHE-1-Inhibition auf die Genexpression in adulten Rattenkardiomyozyten**

Nachdem im Laufe der Arbeit die Kultivierung der adulten Kardiomyozyten optimiert werden konnte, waren damit auch zellbiologische Versuche möglich, die einer relativ großen Ausgangsmenge an Zellen bedurften. Zu diesen Experimenten zählte die vergleichende Genexpressionsanalyse mittels DNA-Chip-Hybridisierungen. Erste Erkenntnisse, welche Gene unter  $\alpha_1$ -adrenerger Stimulation in adulten Rattenkardiomyozyten bzw. unter Ko-Inkubation mit Cariporide reguliert sind, konnten so erstmals in der vorliegenden Arbeit gewonnen und validiert werden. In dieser Arbeit wurden als Filterkriterien Expressionsunterschiede einer 1.7-fachen Hoch- oder Runterregulation sowie einem p-Wert von 0,05 gewählt. Diese Grenzen sind in erster Linie technisch bedingt. Genaue Erkenntnisse, ob eine Modulation unterhalb dieser Grenzen nicht auch eine biologische Relevanz besitzt, sind momentan nicht vorhanden. Der Zeitwert ( $t = 6h$ ) war methodisch bedingt, und ist auf die Anzahl der benötigten Zellen zurückzuführen. Die kurze Stimulationszeit könnte allerdings erklären, warum es unter Phenylephrin-Stimulation zu keiner signifikanten Expressionssteigerung der Markergene BNP und  $\beta$ -MHC in diesem Versuchsaufbau kam.

Besonders auffallend an den in dieser Arbeit zum ersten Mal erhobenen Daten zur Genespressionsanalyse der Hypertrophie in adulten Rattenkardiomyozyten ist die geringe Anzahl der regulierten Gene. An dieser Stelle sollen die wichtigsten der differentiell exprimierten Transkripte und deren Rolle in der Hypertrophieentwicklung diskutiert werden.

Die erste identifizierte Gruppe von drei Genen war unter dem  $\alpha_1$ -adrenergen Stimulus stark hochreguliert, konnte aber unter zusätzlicher NHE-1-Inhibition wiederum auf Kontrollwerte normalisiert werden. Bei diesen regulierten Genen handelte es sich um den Angiotensin-II-Subtyp-AT<sub>1</sub>-Rezeptor (ATR1), die Rho-assoziierte Kinase-1 (ROCK1) sowie das Rezeptor-ähnliche transmembranäre Substrat für die Protein-Tyrosin-Phosphatasen (SHPS-1).

Die Hochregulation des AT<sub>1</sub>-Rezeptors ließ sich in separaten Experimenten auch auf Proteinebene bestätigen (Abbildung 51). Obwohl adulte Kardiomyozyten demnach endogen diesen Rezeptor exprimieren, reagieren sie auf Zugabe des Liganden für diesen Rezeptor,

Angiotensin-II (Ang-II), im Zellkulturmodell mit einer nur schwachen Hypertrophie-Ausbildung (RUF ET AL., 2002). Ursache hierfür könnten u.a. fehlende parakrine Effekte im *in vitro* Modell sein. Mittlerweile ist bekannt, dass Ang-II im Herzgewebe in Nicht-Kardiomyozyten die Freisetzung von EGF stimuliert, welches dann als eigentlicher Effektor in Kardiomyozyten hypertroph wirkt (SHAH & CATT, 2003). Dass am Ende der Hochregulation des AT<sub>1</sub>-Rezeptors an Kardiomyozyten unter Phenylephrin doch eine Bedeutung zukommen könnte, wird durch kürzlich publizierte Ergebnisse der Arbeitsgruppe um ZOU ET AL. nahegelegt (ZOU ET AL., 2004). Diese konnten eine Liganden-unabhängige Aktivierung des AT<sub>1</sub>-Rezeptors mit Anschaltung der nachgeschalteten Hypertrophie-Signalwege unter einfacher mechanischer Belastung aufzeigen. Als Auslöser wurde hier eine Konformationsänderung des Rezeptormoleküls vermutet.

In der vorliegenden Arbeit verhindert die Anwesenheit des NHE-1-Inhibitors Cariporide die Hochregulation des AT<sub>1</sub>-Rezeptors. Aufgrund der sehr kurzen Inkubationszeit und des gewählten *in vitro* Modells sollten zukünftig Folgeexperimente im etablierten Tiermodell zum eventuellen Mechanismus der NHE-1-Intervention in das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System erfolgen, um zur weiteren Aufklärung beizutragen. In diesem Zusammenhang wären vergleichende Versuche mit einem „*angiotensin-converting enzyme*“ (ACE)-Inhibitor, wie Ramipril, einem AT<sub>1</sub>-Inhibitor wie Losartan sowie Cariporide im *in vitro* Modell adulter Rattenkardiomyozyten von großer Bedeutung.

Sowohl in Tiermodellen (für einen Überblick siehe LINZ ET AL., 1995) als auch in adulten Rattenkardiomyozyten (RITCHIE ET AL., 2002) wurde bereits über eine antihypertrophe Wirkung der „*angiotensin-converting enzyme*“ (ACE)-Inhibitoren berichtet. Die Gabe von ACE-Hemmern gilt als Standard-Therapie in der Behandlung der Herzinsuffizienz. Da jedoch die Entwicklung der Herzinsuffizienz ein Prozess aus vielen pathologischen Vorgängen ist, geht die Suche nach neuen pharmakologischen Interventionsmöglichkeiten fortwährend weiter, zudem ACE-Hemmer auch eine Reihe für den Patienten schwerwiegender Nebenwirkungen aufweisen. Im Gegensatz zu ACE-Hemmern und  $\beta$ -Blockern sind die Effekte des NHE-1-Hemmers blutdruckunabhängig (LINZ & BUSCH, 2003) und somit ein zusätzliches Kriterium bezüglich einer Therapieoptimierung.

Ein weiterer wichtiger Vorteil von Cariporide im Vergleich zu ACE-Hemmern wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Cariporide besitzt im Gegensatz zu dem ACE-Inhibitor einen protektiven Effekt auf eine die Herzinsuffizienz begleitende Fibrose. Außerdem wurde der Verlust der kontraktilen Funktion verhindert (ENGELHARDT ET AL., 2002).

Von besonderem Interesse der in dieser Arbeit gefundenen Gene dürfte auch die unter Phenylephrin deutlich hochregulierte Expression von ROCK1 sein. Die ROCK1 gehört zur Rho-Familie der „kleinen“ G-Proteine, bestehend aus Rho, Rac und Cdc42-Unterfamilien, welche allgemein die Organisation des Zytoskeletts in Kardiomyozyten regulieren (HOSHIIJIMA ET AL., 1998). So aktiviert RhoA neben einer ganzen Reihe weiterer Kinasen auch die Rho-Kinase (ROCK1).

HATTORI ET AL. konnten kürzlich zeigen, dass die Inhibition dieser Kinase mit Fasudil, einem oral bioverfügbaren Hemmstoff, in einem Infarktmodell der Maus linksventrikuläres „Remodelling“ und die Ausprägung einer Hypertrophie verhindert (HATTORI ET AL., 2004).

NISHIMARU ET AL. fanden 2003 heraus, dass der Rho/Rock-Signaltransduktionsweg die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität der Kardiomyozyten reguliert. Ein Teil der Agonisten-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität der Herzmuskelzellen könnte durch intrazelluläre Alkanisierung, resultierend aus der Aktivierung des NHE-1, herrühren (TALUKDER ET AL., 1997). Tatsächlich ist in der Literatur berichtet, dass die Aktivierung des Rho/Rock-Signaltransduktionsweges die NHE-1-Aktivität direkt erhöht (TOMINAGA & BARBER, 1998). Von ROCK-Inhibitoren ist bekannt, dass sie in der Lage sind, die durch Phenylephrin-Stimulation ausgelöste Hypertrophie-Antwort zu unterbinden (HINES ET AL., 1998). Viele forschende Firmen untersuchen derzeit eine ROCK-Inhibition in Hinblick auf diverse Herz-Kreislauf-Indikationen. Von großer Relevanz ist die Tatsache, dass die NHE-1-Inhibition die Normalisierung des unter hypertropher Stimulation hochregulierte Gen bewirkte (Tabelle 2, oberes Feld). Weiterhin offen bleibt jedoch die Frage, ob die NHE-1-Inhibition in einer Langzeit-Studie ebenfalls zum gleichen Resultat führen würde, da ROCK in der Regel einer langsamen Regulation unterliegt. Auch dieses Ergebnis sollte in einem Tiermodell mit einer längeren Laufzeit als 24 Stunden wiederholt werden.

Als drittes Gen innerhalb dieser ersten Gruppe wurde das Rezeptor-ähnliche transmembranäre Substrat für die Protein-Tyrosin-Phosphatasen, kurz SHPS-1, identifiziert. Die Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPasen) SHP-1 und SHP-2 spielen eine wichtige Rolle bei Wachstumsfaktor- oder Zytokin-induzierten Signaltransduktionswegen. SHPS-1 stellt ein direktes Substrat v.a. von SHP-2 sowie von Insulin-Rezeptor-Kinasen dar (FUJIOKA ET AL., 1996). Interessanterweise konnte im Zusammenhang mit einer  $\text{AT}_1$ -Rezeptorstimulation auch eine Involvierung der PTPase SHP-2 gefunden werden. Über SHP-2 wird hierbei die  $\text{AT}_1$ -Rezeptorassoziation mit dem bereits diskutierten EGF-Rezeptor erhöht (SETA & SADOSHIMA,

2003). Eine Verknüpfung des SHPS-1 mit Myokard-Hypertrophie und damit mit dem Wirkmechanismus der NHE-1-Inhibition konnte allerdings bis jetzt nicht belegt werden.

Eine zweite Gruppe von Genen zeichnete sich dadurch aus, dass sie unter Phenylephrin moderat hochreguliert, dann aber nicht durch zusätzliche NHE-1-Inhibition normalisiert werden konnte. Besonders auffallend war hier die Verstärkung in der Expression des „*Early growth response*“-Gens 1 (EGR-1). EGR-1 ist ein Transkriptionsfaktor, der zu einer Klasse von „*Immediate early genes*“ (IEG) gehört, die während Wachstums- oder Differentiationsprozessen, aber auch durch hypertrophe Stimuli, wie Endothelin-1 und mechanische Belastung, hochreguliert werden kann (NEYES ET AL., 1993). Für  $\alpha_1$ -adrenerge Stimulation sind entsprechende Ergebnisse aus neonatalen Rattenkardiomyozyten bekannt (IWAKI ET AL., 1990). In diese Gruppe der IEGs lässt sich auch das HOMER1-Transkripts einordnen (BRAKEMAN ET AL., 1997). Da keines der entsprechend induzierten Expressionsmuster unter Cariporide-Behandlung normalisiert war (Tabelle 2, mittlerer Block), kann eine Rolle dieser Gene im Wirkmechanismus der NHE-1-Expression eher ausgeschlossen werden.

Eine dritte Gruppe von Genen wurde unter dem  $\alpha_1$ -adrenergen Stimulus nicht hochreguliert, sehr wohl aber unter der zusätzlichen NHE-1-Inhibition deutlich moduliert. Zu dieser Gruppe zählte u.a. die Cytochrom-P450-Isoform, CYP4A3, die vorwiegend in der Niere und der Leber exprimiert wird (KIMURA ET AL., 1989). In der Leber spielen die Isoenzyme dieser Gattung eine wichtige Rolle im Lipid-Metabolismus und bei der Entgiftung von Xenobiotika. In der Niere katalysieren diese Isoenzyme die  $\omega$ -Hydroxylierung der Arachidonsäure zur 20-Hydroxyeicosatetraenoicssäure (20-HETE). 20-HETE stellt einen starken Vasokonstriktor von renalen Blutgefäßen dar und beeinflusst somit vaskuläre Funktionen sowie den Arterienblutdruck (MARJI ET AL., 2002). Ob dieses Botenmolekül eine bisher nicht bekannte Rolle bei der Herzhypertrophie und des Wirkmechanismus von NHE-1 Inhibitoren spielt, gilt in weiteren Experimenten zu klären.

Ferner wurde in der zusätzlich mit Cariporide-behandelten Gruppe die Herunterregulation des Transkripts „*Secreted protein acidic and rich in cysteine*“ (auch Sparc oder Osteonectin genannt) beobachtet. Dieses anti-adhäsive Protein wurde bereits als spezifisch hochreguliert während der neonatalen Herzentwicklung, der aktiven Phase der Myozytenproliferation, der Bildung von extrazellulärer Matrix und der Angiogenese identifiziert (ENGELMANN, 1993). Erhöhte Osteonectin-Level wurden außerdem in einem hypertrophen Rattenmodell nach

Isoprenalin-Stimulation gefunden (MASSON ET AL., 1998). In diesem Modell konnte die frühe Expression von Osteonectin die Plastizität der extrazellulären Matrix erhöhen und somit die beobachtete Hypertrophie-Entwicklung erleichtern. Ein möglicher kausaler Zusammenhang mit der NHE-1-Inhibition müsste in weiteren Experimenten gezielt untersucht werden.

Bei den zusätzlich mit Cariporide-behandelten Zellen traten zudem etliche weitere runterregulierte Transkripte auf, deren Sequenz bisher noch keiner Proteinfunktion zugeordnet werden konnte (sogenannte EST). Auch in diesem Bereich könnten zukünftige Arbeiten, allerdings erst nach Entschlüsselung der Funktion dieser EST, einen Zusammenhang mit dem Wirkmechanismus der NHE-1 Inhibition erbringen.

Zusammenfassend lässt sich an dieser Stelle sagen, dass eine auf den ersten Blick erstaunlich geringe Anzahl an Genen durch den  $\alpha_1$ -adrenergen Stimulus bzw. durch Hypertrophie-Induktion in ihrer Expression moduliert waren. Interessanterweise wurde bereits 2001 ein Artikel veröffentlicht, der ein ähnliches Phänomen in 4 verschiedenen transgenen Tiermodellen durch vergleichende Genexpressionsanalyse aufdeckte (ARONOW ET AL., 2001). Diese Autoren, aber auch andere Gruppen, konnten kein überlappendes und damit allgemeines Genexpressionsprogramm der Hypertrophie identifizieren und schlussfolgerten, dass die myokardiale Hypertrophie ein Prozess ist, der weniger auf Transkriptionsebene, sondern sehr viel stärker durch selektive Steuerung der Translation entsteht (siehe hierzu auch HANNAN ET AL., 2003; MAMANE ET AL., 2004). Trotz der in dieser Arbeit gefundenen geringen Anzahl an regulierten Genen sollten gerade die dazugehörigen Signalwege besonders im Zusammenhang mit der NHE-1-Inhibition in Zukunft stärker verifiziert werden.

#### **4.5 Abschließende Betrachtung**

Der Myokardinfarkt ist eine der Haupttodesursachen unserer Zeit in den westlichen Industrieländern. Aufgrund der stets älter werdenden Bevölkerung und verbesserten Therapiemöglichkeiten des Myokardinfarktes, die zu einer höheren Überlebensrate führen, steigt jedoch konsekutiv die Rate der Herzinsuffizienzinzidenz. Trotz verbesserter Möglichkeiten der Diagnose und Therapie stellt auch die Herzinsuffizienz somit eines der bedeutendsten Gesundheitsprobleme in den Industrienationen dar und zählt neben nicht beherrschbaren Rhythmusstörungen zu den Haupttodesursachen nach Myokardinfarkt. Eine der wichtigsten Komponenten, die den Herzinsuffizienz-Prozess unterstützen, ist die initiale, maladaptive Hypertrophie nach myokardialer Schädigung.



Inzwischen ist belegt, dass der NHE-1 am Zellwachstum bzw. an der Entwicklung der kardialen Hypertrophie und dem Remodelling beteiligt ist und somit zum Prozess der Herzinsuffizienz beitragen könnte.

Wie die vorliegende Arbeit zeigt, eignen sich adulte Rattenkardiomyozyten als hochrelevantes Modellsystem hervorragend, um die antihypertrophen Wirkungen von NHE-1-Inhibitoren zu überprüfen und bestätigen.

Cariporide wurde bisher nicht nur in einer Vielfalt von experimentellen Modellen und Tierspezies, sondern auch in klinischen Studien untersucht. Der GUARDIAN Trial (GUARD During Ischemia Against Necrosis) war die erste groß angelegte Phase II/III-Studie. 11.590 Menschen mit akutem Koronarsyndrom, unabhängig welcher Genese, wurden als Risikopatienten für einen Myokardinfarkt in die Studie aufgenommen. Bezogen auf den kombinierten Endpunkt Myokardinfarkt bzw. Mortalität ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Placebo und mit Cariporide behandelten Patienten. Eine nachträgliche Metaanalyse zeigte jedoch, dass bei einer Patientensubpopulation, die vor einer Bypass-Operation die höchste Dosierung von Cariporide erhalten hatten (120 mg i.v. alle 8 Std.) eine signifikante Reduktion der Todes- und Myokardinfarktrate von -24,7% beobachtet werden konnte (Weber et al., 2002). Um das Ergebnis dieser Metaanalyse auch klinisch zu bestätigen, wurde im folgenden eine Phase III-Studie nur an Patienten mit einer Bypass-Operation durchgeführt (EXPEDITION Trial (the sodium-hydrogen EXchange inhibition to Prevent coronary Events in acute cardiac conDITIONs)) (BOLLI, 2003), deren Ergebnisse noch nicht publiziert sind.

Derzeit sind noch keine klinischen Daten zu Studien bekannt, die einen NHE-1-Inhibitor in Zusammenhang mit Herzinsuffizienz untersuchen. Die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit demonstrieren jedoch die potentielle klinische Relevanz einer kausalen oder permissiven Rolle der sarcolemmalen NHE-1-Aktivität in der Entwicklung der myokardialen Hypertrophie/ Fibrose und einem Fortschreiten zur Herzinsuffizienz. Die vorliegende Arbeit liefert aus einem Zellkulturmodell heraus neuartige Ansatzpunkte zur Beantwortung der Frage, nach welchem Mechanismus NHE-1-Inhibitoren die Hypertrophie *in vitro* hemmen könnten. Wichtige weitere Befunde hierzu könnten die Untersuchungen zur Translokation der Kinasen liefern, sowie die Bestätigung der Daten der Genexpressionsanalyse in weiteren *in vitro* und *in vivo* Studien. Es sollte auch stets bedacht werden, dass der NHE-1 einen ubiquitär exprimierten Transporter darstellt, welcher zwar neuartige therapeutische Ansatzpunkte zur

Behandlung kardialer Erkrankungen liefert, aber genau so auch das Risiko von unerwünschten Nebenwirkungen trägt.

Obwohl viele der hier gezeigten Ergebnisse besonders in bezug auf Signaltransduktionsmechanismen in der Hypertrophie-Entwicklung, weiterer intensiver Forschung bedürfen, ermutigen die vorliegenden experimentellen Daten, die NHE-1-Inhibition als therapeutische Strategie für die effektive Behandlung der Hypertrophie einzustufen.

## **5 Zusammenfassung**

Die Inhibition des Natrium-Protonen-Austauschproteins, Subtyp-1 (NHE-1), stellt möglicherweise ein wichtiges Prinzip zur Behandlung der Herzhypertrophie und damit der frühen Herzinsuffizienz dar. Als Ausgangspunkt dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der oral bioverfügbare und selektive NHE-1-Inhibitor Cariporide dabei u.a. in einem transgenen Tiermodell wirkt, bei dem die Hypertrophie nicht durch Myokardinfarkt, sondern mittels transgener Überexpression des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors erzeugt wurde, die Hypertrophie-Entwicklung verhinderte.

Um die Wirkung und vor allem den Wirkmechanismus von NHE-1-Inhibitoren näher zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein zelluläres Modell der  $\alpha_1$ -adrenergen Hypertrophie-Induktion in adulten Kardiomyozyten aus Rattenherzen aufgebaut und mittels gängiger Parameter wie Zellvolumen, Protein und RNA-Neusynthese validiert. Dabei konnte ein klassenspezifischer Hemmeffekt aller eingesetzten NHE-1-Inhibitoren auf die untersuchten Hypertrophie-Parameter gezeigt werden.

Interessante molekulare Mechanismen der Hypertrophie-Inhibition durch spezifische NHE-1-Inhibitoren konnten in der vorliegenden Arbeit aufgedeckt werden. Nach  $\alpha_1$ -adrenerger Stimulation und gleichzeitiger NHE-1-Inhibition waren nur wenige Gene in ihrer Expression deutlich differentiell reguliert, darunter der Angiotensin-II AT-1 Rezeptor und die sogenannte Rho-kinase (ROCK). Aus dieser Erkenntnis heraus ergeben sich neue mögliche Ansatzpunkte zum Wirkmechanismus von NHE-1-Inhibitoren.

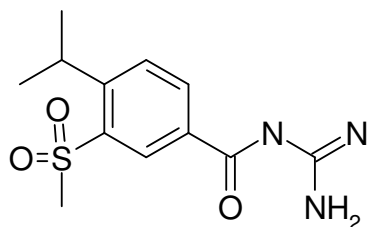
Im Gegensatz zu Befunden bei Herzischämie scheint es bei der Herzhypertrophie im vorliegenden Modell keine Kopplung zwischen dem NHE-1 und einem weiteren Austauschprotein, dem Natrium-Calcium-Austauscher, zu geben. Die Hypertrophie der adulten Kardiomyozyten ließ sich nicht durch einen selektiven Hemmstoff dieses Austauschers, SEA0400, hemmen.

Bei näherer Untersuchung auf Translationsebene zeigten sich überraschende Ergebnisse, die für eine Hemmung der Hypertrophie-Entwicklung in Anwesenheit eines NHE-1-Inhibitors verantwortlich gemacht werden könnten. So war auf der einen Seite die Translokation von in adulten Kardiomyozyten exprimierten PKC-Subtypen ( $\delta$  und  $\epsilon$ ) vom Zytosol an die Plasmamembran durch die NHE-1-Inhibition signifikant beeinflusst. Auf der anderen Seite war die Phosphorylierung bestimmter NHE-1-aktivierender Kinasen über den gesamten betrachteten Zeitraum verstärkt vorhanden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass neben

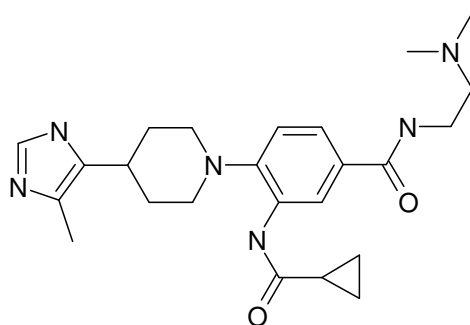
möglichen Autoregulationseffekten in der Zelle, ausgelöst durch eine NHE-1-Inhibition, eine weitere Wirkkomponente eine Rolle bei der Beeinflussung intrazelluläre membranabhängiger Translokation spielen könnten.

## **6    Anhang**

### Anhang A: Strukturformeln ausgewählter NHE-1-Inhibitoren



Cariporide (HOE642, 379.5 g/mol)



S9797 (438.6 g/mol)

## **7 Literaturverzeichnis**

**Abraham WT.** (2000)  $\beta$ -Blockers. *Arch Intern Med.* **160**: 1237-1247

**Albert CJ, Ford DA.** (1999) Protein kinase C translocation and PKC-dependent protein phosphorylation during myocardial ischemia. *Am J Physiol.* **276**: H642-H650

**Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR.** (1995) PD098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* **270**: 27489-27494

**Alessi DR, Kozlowski MT, Weng QP, Morrice N, Avruch J.** (1998) 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) phosphorylates and activates the p70 S6 kinase in vivo and in vitro. *Curr. Biol.* **8**: 69–81

**Allo SN, Carl LL, Morgan HE.** (1992) Acceleration of growth of cultured cardiomyocytes and translocation of protein kinase C. *Am J Physiol.* **263(2Pt1)**: C319-25

**Alon U, Barkai N, Notterman DA, Gish K, Ybarra S, Mack D.** (1999) Broad patterns of gene expression revealed by clustering analysis of tumor and normal colon tissues probed by oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci USA.* **96**: 6745-6750

**Anversa P, Kajstura J, Olivetti G.** (1996) Myocyte death in heart failure. *Current Opinion Cardiol.* **11**: 245-251

**Aronow BJ, Toyokawa T, Canning A, Haghighi K, Delling U, Kranias E, Molkentin JD, Dorn GW 2<sup>nd</sup>.** (2001) Divergent transcriptional responses to independent genetic causes of cardiac hypertrophy. *Physiol Genomics.* **6(1)**:19-28

**Aronson PS.** (1985) Kinetic properties of the plasma membrane  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ exchanger. *Annu Rev Physiol.* **47**: 545-560

**Armstrong SC.** (2004) Protein kinase activation and myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* **61(3)**:427-36

**Avkiran M, Haworth RS.** (2003) Regulatory effects of G protein-coupled receptors on cardiac sarcolemmal  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger activity: signalling and significance. *Cardiovascular Research.* **57**: 942–952

**Avruch J, Belham C, Weng Q, Hara K, Yonezawa K.** (2001) The p70 S6 kinase integrates nutrient and growth signals to control translational capacity. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **26**: 115–1549

**Baid MK, Mahon N, McKenna WJ, Caforio ALP, Bonow RO, Francis GS, Gheorghiade M.** (1998) The pathophysiology of advanced heart failure. *Am Heart J.* **135**: 216-230

**Bell D, Schluter KD, Zhou XJ, McDermott BJ, Piper HM.** (1995) Hypertrophic effects of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and amylin on adult mammalian ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* **27(11)**: 2433-43

- Beltrami CA, Finato N, Rocco M, Feruglio GA, Puricelli C, Cigola F, et al.** (1995) The cellular basis of dilated cardiomyopathy in humans. *Cardiol.* **27**: 291-305
- Bianchini L, L'Allemain G, Pouysségur J.** (1996) The p42/p44 mitogen-activated protein kinase cascade is determinant in mediating activation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (NHE1 isoform) in response to growth factors. *J Biol Chem.* **272**: 271-9
- Bolli R.** (2003) The role of sodium-hydrogen ion exchange in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *J Card Surg*, 18 Suppl. **1**: 21-6
- Blohm D & Guiseppi-Elie A.** (2001) New developments in microarray technology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**: 41-47
- Bogoyevitch MA & Sugden PH.** (1996) The role of Protein Kinases in Adaptational Growth of the heart. *Int J Biochem Cell Biol.* **28**: 1-12
- Bogoyevitch MA, Parker PJ, Sugden PH.** (1993) Characterization of protein kinase C isotype expression in adult rat heart. Protein kinase C-epsilon is a major isotype present, and it is activated by phorbol esters, epinephrine, and endothelin. *Circ Res.* **72(4)**: 757-67
- Böhm M.** (2002).. Pathophysiology of chronic heart failure today. *Herz.* **27**: 75-91
- Brakeman PR, Lanahan AA, O'Brien R, Roche K, Barnes CA, Huganir RL, Worley PF.** (1997) Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. *Nature.* **386(6622)**: 284-8
- Brant SR, Yun CHC, Donowitz M, Tse CM.** (1995) Cloning tissue distribution and functional analysis of the human Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Exchanger isoform NHE3. *Am. J. Physiol.* **269**: C198-C206
- Brodde OE.** (1993) Beta-adrenoceptors in cardiac disease. *Pharmacol Ther.* **60(3)**: 405-30
- Brown NJ, Vaughan DE.** (1998) Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors. *Circulation.* **97**: 1411-1420
- Burckhardt G, Di Sole F, Helmle-Kolb C.** (2002) The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger gene family. *J Nephrol.* **15 (suppl.5)**: S3 -S21
- Burgaisky LB, Gupta M, Zak R.** (1992) Cellular and molecular mechanisms of cardiac hypertrophy. In: Forzard HA, editor. *The Heart and Cardiovascular System. 2nd ed.*, New York: Raven: 1621-40
- Bussolino F, Wang JM, Turrini F, Alessi D, Ghigo D, Costamagna C, Pescarmona G, Mantovani A, Bosia A.** (1989) Stimulation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in human endothelial cells activated by granulocyte- and granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor. Evidence for a role in proliferation and migration. *J Biol Chem.* **264(31)**: 18284-7
- Buxton IL, Brunton LL.** (1986) Alpha-adrenergic receptors on rat ventricular myocytes: characteristics and linkage to cAMP metabolism. *Am J Physiol.* **251(2 Pt 2)**: H307-13

- Camilion de Hurtado MC, Portiansky EL, Perez NG, Rebolledo OR, Cingolani HE.** (2002). Regression of cardiomyocyte hypertrophy in SHR following chronic inhibition of the Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger. *Cardiovasc Res.* **53**(4): 862-868
- Carvalho RF, Cicogna AC, Campos GE, De Assis JM, Padovani CR, Okoshi MP, Pai-Silva MD.** (2003) Myosin heavy chain expression and atrophy in rat skeletal muscle during transition from cardiac hypertrophy to heart failure. *Int J Exp Pathol.* **84**(4): 201-6.
- Chomczynski P, Sacchi N.** (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.* **162**: 156-159
- CIBIS-II Investigators and Committees** (1999) The cardiac insufficiency bisoprolol study II: a randomised trial. *Lancet*, **353**: 9-13
- Cingolani HE, Alvarez BV, Ennis IL, Camilion de Hurtado MC.** (1998) Stretch induced alkalization of feline papillary muscle. *Circ Res.* **83**: 775-779
- Clark WA, Rudnick SJ, LaPres JJ, Andersen LC, LaPointe MC.** (1993) Regulation of hypertrophy and atrophy in cultured adult heart cells. *Circ Res.* **73**(6): 1163-76
- Clerk A, Bogoyevitch MA, Fuller SJ, Lazou A, Parker PJ, Sugden PH.** (1995) Expression of protein kinase C isoforms during cardiac ventricular development. *Am J Physiol.* **269**: H1087- H1097
- Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N.** (2000) Cardiac remodelling - concepts and clinical implications. *J Am Coll Cardiol.* **35**: 569-82
- Communal C, Singh K, Sawyer DB, Colucci WS.** (1999) Opposing effects of  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis. *Circulation.* **100**: 2210-2
- Conus NM, Hemmings BA, Pearson RB.** (1998) Differential regulation by calcium reveals distinct signaling requirements for the activation of Akt and p70S6k. *J. Biol. Chem.* **273**: 4776-4782
- Counillon L, Scholz W, Lang HJ, Pouyességur J.** (1993) Pharmacological characterization of stably transfected Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter isoforms using amiloride analogs and new inhibitor exhibiting anti-ischemic properties. *Mol Pharmacol.* **44**: 1041-1045
- Counillon L, Pouyssegur J.** (2000) The expanding family of eucaryotic Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers. *J Biol Chem.* **275**: 1-4
- Crabtree GR, Olson EN.** (2002) NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell.* **109** Suppl: S67-79
- Decker RS, Cook MG, Behnke-Barclay MM, Decker ML, Lesch M, Samarel AM.** (1993) Catecholamines modulate protein turnover in cultured, quiescent rabbit cardiac myocytes. *Am J Physiol.* **265**(1Pt2): H329-39
- Del Monte F, O'Gara P, Poole-Wilson PA, Yacoub M, Harding SE.** (1995) Cell geometry and contractile abnormalities of myocytes from failing human left ventricle. *Cardiovasc. Res.* **30**(2): 281-90



- Denker SP & Barber DL.** (2002) Cell migration requires both ion translocation and cytoskeletal anchoring by the NA-H exchanger NHE1. *J Cell Biol.* **15(6)**: 1087-1096
- Denolin H, Kuhn H, Kraysenbuehl HP, Loogen F, Reale A.** (1983) The definition of heart failure. *Eur Heart J.* **4(7)**: 445-8
- Dorn GW 2nd, Brown JH.** (1999) Gq signaling in cardiac adaptation and maladaptation. *Trends Cardiovasc Med.* **9(1-2)**: 26-34
- Dufner A, Thomas G.** (1999) Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation. *Exp Cell Res.* **253(1)**: 100-9
- Dzau JV, Re R.** (1994) Tissue angiotensin system in cardiovascular medicine: a paradigm shift? *Circulation.* **89**: 493-498
- Eguchi S, Matsumoto T, Motley ED, Utsunomiya H, Inagami T.** (1996) Identification of an essential signalling cascade for mitogen-activated protein kinase activation by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* **271**: 14169-14175
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO & Botstein D.** (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA.* **95**: 14863-14868
- Engelhardt S, Hein L, Keller U, Klambt K, Lohse MJ.** (2002) Inhibition of Na(+)-H(+) exchange prevents hypertrophy, fibrosis, and heart failure in beta(1)-adrenergic receptor transgenic mice. *Circ Res.* **90(7)**: 814-9
- Engelhardt S, Hein L, Wiesmann F, Lohse MJ.** (1999) Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* **96(12)**: 7059-64
- Engelmann GL.** (1993) Coordinate gene expression during neonatal rat heart development. A possible role for the myocyte in extracellular matrix biogenesis and capillary angiogenesis. *Cardiovasc Res.* **27(9)**: 1598-605
- Erdos EG** (1977) The angiotensin I converting enzyme. *Fed. Proc.* **36**: 1760-1765
- Erikson RL.** (1991) Structure, expression, and regulation of protein kinases involved in the phosphorylation of ribosomal protein S6. *J Biol Chem.* **266**: 6007-6010
- Fliegel L.** (2001). Regulation of myocardial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger activity. *Basic Res Cardiol.* **96**: 301-305
- Frey N, Olson EN.** (2003) CARDIAC HYPERTROPHY: The Good, the Bad, and the Ugly. *Annu Rev. Physiol.* **65**: 45-79
- Fujioka Y, Matozaki T, Noguchi T, Iwamatsu A, Yamao T, Takahashi N, Tsuda M, Takada T, Kasuga M.** (1996) A novel membrane glycoprotein, SHPS-1, that binds the SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-2 in response to mitogens and cell adhesion. *Mol Cell Biol.* **12**: 6887-99
- Fuller SJ, Gaitanaki CJ, Sugden PH.** (1990) Effects of catecholamines on protein synthesis in cardiac myocytes and perfused heart isolated from adult rats. *Biochem J.* **266**: 727-736

**Gheorghiade M, Cody RJ, Francis GS, McKenna WJ, Young JB, Bonow RO** (1998). Current medical therapy for advanced heart failure. *Am Heart J.* **132**: 231-248

**Gheorghiade M, Hall VB, Jacobsen G, Alam M, Rosman H, Goldstein S** (1995). Effects of increasing maintenance dose of digoxin on left ventricular function and neurohormones in patients with chronic heart failure treated with diuretics and angiotensin-converting-enzyme inhibitors. *Circulation.* **92**: 1801-7

**Glembotski CC, Irons CE, Krown KA, Murray SF, Sprenkle AB, Sei CA.** (1993) Myocardial  $\alpha$ -thrombin receptor activation induces hypertrophy and increases atrial natriuretic factor gene expression. *J Biol Chem.* **268**: 20646-52

**Glennon PE, Kaddoura S, Sale EM, Sale GJ, Fuller SJ, Sudgen PH.** (1996) Depletion of mitogen-activated protein kinase using an antisense oligodeoxynucleotide approach downregulates the phenylephrine-induced hypertrophic response in rat cardiac myocytes. *Circ Res.* **78**: 954-961

**Goldman S and Raya TE.** (1995) Rat infarct model of myocardial infarction and heart failure. *J. Card. Fail.* **1**:169-177

**Goss GG, Woodside M, Wakabayashi S, et al.** (1994) ATP dependence of NHE-1, the ubiquitous isoform of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter: analysis of phosphorylation and subcellular localization. *J Biol Chem.* **269**: 8741-8

**Gu JW, Anand V, Shek EW, Morre MC, Brady AL, Kelly WC, Adair TH.** (1998) Sodium induces hypertrophy of cultured myocardial myoblasts and vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* **31**: 1083-1087

**Gu XH, Ou RC, Casley DJ, Daly MJ, Nayler WG.** (1992) Effect of age on endothelin-1 binding sites in rat cardiac ventricular membranes. *J Cardiovasc Pharmacol.* **19**: 764-769

**Gunasegaram S, Haworth RS, Hearse DJ.** (1999) Regulation of sarcolemmal  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger activity by angiotensin II in adult rat ventricular myocytes: opposing actions via AT1 versus AT2 receptors. *Circ Res.* **85**: 919-30

**Hammerer-Lercher A, Ludwig W, Falkensammer G, Muller S, Neubauer E, Puschendorf B, Pachinger O, Mair J.** (2004) Natriuretic Peptides as Markers of Mild Forms of Left Ventricular Dysfunction: Effects of Assays on Diagnostic Performance of Markers. *Clin Chem.* **In press**

**Hannan RD, Jenkins A, Jenkins AK, Brandenburger Y.** (2003) Cardiac hypertrophy: A matter of translation. *Clin. Exp. Pharma. Physiol.* **30**: 517-527

**Hattori T, Shimokawa H, Higashi M, Hiroki J, Mukai Y, Tsutsui H, Kaibuchi K, Takeshita A.** (2004) Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Circulation.* **109(18)**: 2234-9

**Hayasaki-Kajiwara Y, Kitano Y, Iwasaki T, Shimamura T, Naya N, Iwaki K, Nakajima M.** (1999)  $\text{Na}^+(\text{+})/\text{H}^+(\text{+})$  exchange activates protein kinase C isozymes delta and epsilon in cultured neonatal rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* **31(8)**: 1559-72

- Hendrix M, Mubagwa K, Verdonck F, et al.** (1994) New  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  exchange inhibitor HOE 694 improves postischemic function and high energy phosphate resynthesis and reduces  $\text{Ca}^{2+}$  overload in isolated perfused rabbit heart. *Circulation*. **90**: 123-129
- Hines WA, Thorburn A.** (1998) Ras and rho are required for galphaq-induced hypertrophic gene expression in neonatal rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. **30** 485-94
- Hoshijima M, Sah VP, Wang Y, Chien KR, Brown JH.** (1998) The low molecular weight GTPase Rho regulates myofibril formation and organization in neonatal rat ventricular myocytes. Involvement of Rho kinase. *J Biol Chem*. **273** 7725-30
- Hori M, Nakatsubo N, Kagiya T.** (1990) The role of  $\text{Na}^+\text{/H}^+$  exchanger in norepinephrine-induced protein synthesis in neonatal cultured cardiomyocytes. *Jpn Circ J*. **54**: 535-539
- Hunter JJ, Chien KR.** (1999) Signaling pathways for CH and failure. *N Engl J Med*. **341** (17): 1276-1283
- Ikeda U, Tsuruya Y, Yanginuma T.** (1991)  $\alpha$ 1-adrenergic stimulation is coupled to cardiac myocyte hypertrophy. *Am J Physiol*. **260**: H953-H956
- Iwaki K, Sukhatme VP, Shubeita HE, Chien KR.** (1990) Alpha- and beta-adrenergic stimulation induces distinct patterns of immediate early gene expression in neonatal rat myocardial cells. fos/jun expression is associated with sarcomere assembly; Egr-1 induction is primarily an alpha 1-mediated response. *J Biol Chem*. **265**(23): 13809-17
- Iwakura K, Hori M, Watanabe Y, Kitabatake A, Cragoe EJ Jr, Yoshida H, Kamada T.** (1990) Alpha 1-adrenoceptor stimulation increases intracellular pH and  $\text{Ca}^{2+}$  in cardiomyocytes through  $\text{Na}^+\text{/H}^+$  and  $\text{Na}^+\text{/Ca}^{2+}$  exchange. *Eur J Pharmacol*. **186**: 29-40
- Jackson G, Gibbs CR, Davies MK, Lip GYH.** (2000) Heart failure pathophysiology. *BMJ*. **320**: 167-170
- Jandeleit-Dahm K, Hannan KM, Farrelly CA, Allen TJ, Rumble JR, Gilbert RE, Cooper ME, Little PJ.** (2000) Diabetes-induced vascular hypertrophy is accompanied by activation of  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  exchange and prevented by  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  exchange inhibition. *Circ Res*. **87**: 1133-1149
- Jefferies BJ, Reinhard C, Kozma SC, Thomas G.** (1994) Rapamycine selectively represses translation of the "pyrimidin tract" mRNA family. *Proc Natl Acad Sci USA*. **91**: 4441-5
- Johnatty SE., Dyck JRB., Michael LH., Olson EN and Abdellatif M.** (2000) Identification of genes regulated during mechanical load-induced cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*. **32**: 805-815
- Johnston CI.** (2000) Angiotensin II type 1 receptor blockade: a novel therapeutic concept. *Blood Press Suppl*. **1**: 9-13
- Kajstura J, Cigola E, Malhotra A, Li P, Cheng W, Meggs LG, Anversa P.** (1997) Angiotensin II induces apoptosis of adult ventricular myocytes in vitro. *J Mol Cell Cardiol*. **29**: 859-870

- Kanevskij M, Taimor G, Schäfer M, Piper HM, Schlüter K-D.** (2002) Neuropeptide Y modifies the hypertrophic response of adult ventricular cardiomyocytes to norepinephrine. *Cardiovasc Res.* **53**: 879-887
- Karmazyn M, Gan XT, Humphreys RA, Yoshida H, Kusumoto K.** (1999) The myocardial  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  exchange. Structure, regulation and its role in heart disease. *Circ. Res.* **85**: 777-786
- Karmazyn M, Sostaric JV and Gan XT.** (2001) The myocardial  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Exchanger: A potential therapeutic target for prevention of myocardial ischaemic and reperfusion injury and attenuation of postinfarction heart failure. *Drugs.* **61(3)**: 375-389
- Karmazyn M.** (1996) The sodium-hydrogen exchange system in the heart: its role in ischemic and reperfusion injury and therapeutic implications. *Can J Cardiol.* **12(10)**: 1074-82
- Karmazyn M.** (2001) Therapeutic potential of  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  exchange inhibitors for the treatment of heart failure. *Exp Opin Invest Drugs.* **10(5)**: 835-843
- Kasten FH.** (1972) Rat myocardial cells in vitro: mitosis and differentiated properties. *In Vitro.* **8**: 128-150
- Khandoudi N, Ho J, Karmazyn M.** (1994) Role of sodium/hydrogen exchange in mediating the effects of endothelin-1 on the normal and ischemic and reperfused heart. *Circ Res.* **75**: 369-78
- Kimura S, Hardwick JP, Kozak CA, Gonzalez FJ.** (1989) The rat clofibrate-inducible CYP4A subfamily. II. cDNA sequence of IVA3, mapping of the Cyp4a locus to mouse chromosome 4, and coordinate and tissue-specific regulation of the CYP4A genes. *DNA.* **7**: 517-25
- Klein M, Seeger P, Schuricht B, Alper SL, Schwab A.** (2000) Polarization of  $\text{Na}(+)/\text{H}(+)$  and  $\text{Cl}(-)/\text{HCO}_3(-)$  exchangers in migrating renal epithelial cells. *J Gen Physiol.* **115(5)**: 599-608
- Kleyman T, Cragoe EJ.** (1988) Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport. *J Membr Biol.* **105**: 1-21
- Kohn J.** (1958) Small scale membrane filter electrophoresis and immunoelectrophoresis. *Clin Chim Acta.* **3**: 450-454
- Komuro I, Kaida T, Shibasaki Y, Kurabayashi M, Hoh W, Takaku F, Yazaki Y.** (1990) Stretching cardiac myocytes stimulates prooncogene expression. *J Biol Chem.* **265**: 3595-3598
- Kusuhara M, Takahashi E, Peterson TE, Abe J, Ishida M, Han J, Ulevitch R, Berk BC.** (1998) p38 Kinase is a negative regulator of angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle cells: effects on  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange and ERK1/2. *Circ Res.* **83(8)**: 824-31
- Ladilov Y, Haffner S, Balser-Schafer C, Maxeiner H, Piper HM.** (1999) Cardioprotective effects of KB-R7943: a novel inhibitor of the reverse mode of  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger. *Am-J-Physiol.* **276 (6 Pt 2)**: H1868-76
- Laemmli UK.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685

- Laser M, Kasi VS, Hamawaki M, Cooper G 4th, Kerr CM, Kuppuswamy D.** (1998) Differential activation of p70 and p85 S6 kinase isoforms during cardiac hypertrophy in the adult mammal. *J. Biol. Chem.* **273**: 24610–24619
- Lazou A, Bogoyevitch MA, Orfali KA, Sudgen PH.** (1994) Characterization of the stimulation of phosphoinositide hydrolysis by  $\alpha$ 1-adrenergic agonists in adult rat heart. *Am J Physiol.* **267**: H970-H978
- Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB and Castelli WP.** (1990) Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N. Engl. J. Med.* **322**: 1561-1566
- Linz WJ, Wiemer G, Gohlke P, Unger T, Schölkens BA** (1995) Contribution of Kinins to the cardiovascular Actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Pharmacological reviews.* **47**(1): 25-49
- Linz WJ & Busch AE.** (2003) NHE-1 inhibition: from protection during acute ischaemia/reperfusion to prevention/ reversal of myocardial remodelling. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* **368**: 239-246
- Linzbach AJ.** (1974) Aging and polypathy as illustrated on the human heart. *Med Klin.* **69**(47): 1915-26
- Lohse MJ.** (1992) Mechanisms of  $\beta$ -adrenergic receptor desensitization. In: Signal Transmission. in Photoreceptor Systems. Hargave PA, Hofman KP, Kaupp UB (Eds.). Springer Verlag, Berlin: 160-171
- Long CS, Hartogensis WE, Simpson PC.** (1993) Beta-adrenergic stimulation of cardiac non-myocytes augments the growth-promoting activity of non-myocyte conditioned medium. *J Mol Cell Cardiol.* **25**(8): 915-25
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL & Randall RJJ.** (1951) *J Biol. Chem.* **193**: 265-275
- Mair J, Hammerer-Lercher A, Puschendorf B.** (2001) The impact of cardiac natriuretic peptide determination on the diagnosis and management of heart failure. *Clin Chem Lab Med.* **39**: 571
- Mamane Y, Petroulakis E, Rong L, Yoshida K, Ler LW, Sonenberg N.** (2004) eIF4E--from translation to transformation. *Oncogene.* **23**(18): 3172-9
- Marban E, Koretsune Y.** (1990) Cell calcium, oncogenes, and hypertrophy. *Hypertension.* **15**: 652-658
- Marji JS, Wang MH, Laniado-Schwartzman M.** (2002) Cytochrome P-450 4A isoform expression and 20-HETE synthesis in renal preglomerular arteries. *Am J Physiol Renal Physiol.* **283**(1): F60-7
- Masson S, Arosio B, Luvara G, Gagliano N, Fiordaliso F, Santambrogio D, Vergani C, Latini R, Annoni G.** (1998) Remodelling of cardiac extracellular matrix during beta-adrenergic stimulation: upregulation of SPARC in the myocardium of adult rats. *J Mol Cell Cardiol.* **30**(8): 1505-14

- Matsuda T, Arakawa N, Takuma K, Kishida Y, Kawasaki Y, Sakaue M, Takahashi K, Takahashi T, Suzuki T, Ota T, Hamano-Takahashi A, Onishi M, Tanaka Y, Kameo K, Baba A.** (2001) SEA0400, a novel and selective inhibitor of the Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger, attenuates reperfusion injury in the in vitro and in vivo cerebral ischemic models. *J Pharmacol Exp Ther.* **298**(1): 249-56
- Matsui H, Barry WH, Livsey C.** (1995) AngiotensinII stimulates sodium-hydrogen exchange in adult rabbit ventricular myocytes. *Cardiovasc Res.* **29**: 215-21
- McDermott P, Morgan HE.** (1989) Contraction modulates the capacity for protein synthesis during growth of neonatal heart cells in culture. *Circ Res.* **64**(3): 542-53
- Meidell RS, Sen A, Henderson SA, Slahetka MF, Chien KR.** (1986) Alpha 1-adrenergic stimulation of rat myocardial cells increases protein synthesis. *Am J Physiol.* **251**(5Pt2): H1076-84
- Menard J, Guyene TT, Chatellier G, Kleinbloesem CH, Bernadet P.** (1991) Renin release regulation during acute renin inhibition in normal volunteers. *Hypertension.* **18**(3): 257-65
- Mentzer RM, Lasley RD, Jessel A, Karmazyn M.** (2003) Intracellular sodium hydrogen exchange inhibition and clinical myocardial protection. *Ann Thorac Surg.* **75**: 700-8
- Molkentin JD.** (2000) Calcineurin and beyond – Cardiac hypertrophic signalling. *Circ Res.* **87**: 731-738
- Moor AN, Fliegel L.** (1999) Protein kinase-mediated regulation of the Na(+)/H(+) exchanger in the rat myocardium by mitogen-activated protein kinase-dependent pathways. *J Biol Chem.* **274**(33): 22985-92
- Morgan HE, Baker KM.** (1991) Cardiac hypertrophy: mechanical, neural, and endocrine dependence. *Circulation.* **83**: 13-25
- Neyses L, Nouskas J, Luyken J, Fronhoffs S, Oberdorf S, Pfeifer U, Williams RS, Sukhatme VP and Vetter H.** (1993) Induction of immediate-early genes by AngiotensinII and endothelin-1 in adult rat cardiomyocytes. *J Hypertens.* **11**: 927-934
- Nicholas SB, Philipson KD.** (1999) Cardiac expression of the Na(+)/Ca(2+) exchanger NCX1 is GATA factor dependent. *Am J Physiol.* **277**(1 Pt 2): H324-30
- Niggli E, Lederer WL.** (1991) Restoring forces in cardiac myocytes insight from relaxations induced by photolysis of caged ATP. *Biophys J.* **59**: 1123 – 1135
- Nishimaru K, Tanaka Y, Tanaka H, Shigenobu K.** (2003) Inhibition of agonist-induced positive inotropy by a selective Rho-associated kinase inhibitor, Y-27632. *J Pharmacol Sci.* **92**(4): 424-7.
- Nishizuka Y.** (1995) Protein Kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* **9**: 494-496
- Olson EN, Molkentin JD.** (1999) Prevention of cardiac hypertrophy by calcineurin inhibition- Hope or hype? *Circ. Res.* **84**: 623-632

- Olson EN.** (2004) A decade of discoveries in cardiac biology. *Nat Med.* **10**(5): 467-74
- Omura T, Yoshiyama M, Yoshida K, Nakamura Y, Kim S, Iwao H, Takeuchi K, Yoshikawa J.** (2002) Dominant negative mutant of c-Jun inhibits cardiomyocyte hypertrophy induced by endothelin 1 and phenylephrine. *Hypertension.* **39**(1): 81-6
- Orlowski J, Grinstein S.** (1997)  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchangers of mammalian cells. *J Biol Chem* **272**: 22373-22376
- Packer M, Coats AJ, Fowler MB, et al.** (2001) Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure. *N Engl J Med.* **344**: 1651-1658
- Parker TG, Packer SE, Schneider MD.** (1990) Peptide growth factors can provoke „fetal“ contractile protein gene expression in rat cardiac myocytes. *J Clin Invest.* **85**: 507-14
- Pasumarthi KB, Field LJ.** (2002) Cardiomyocyte cell cycle regulation. *Circ Res.* **90**: 1044-54
- Patten M, Hartogensis WE, Long CS.** (1996) Interleukin-1 $\beta$  is a negative transcriptional regulator of  $\alpha$ -1-adrenergic induced gene expression in cultured cardiac myocytes. *J Biol Chem*; **271**: 21134-21141
- Petrecca K, Atanasiu R, Grinstein S, Orlowski J, Shrier A.** (1999). Subcellular localization of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger NHE1 in rat myocardium. *Am J Physiol.* **276**: H709-H717
- Pfeffer MA, Braunwald E.** (1990). Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation.* **81**: 1161-72
- Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA and Braunwald E.** (1979) Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ. Res.* **44**: 503-512
- Pike MM, Luo CS, Clark MD, Kirk KA, Kitakaz M, Madden MC, Cragoe EJ, Pohost GM.** (1993). NMR measurements of  $\text{Na}^+$  and cellular energy in ischemic rat heart: role of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange. *Am J Physiol.* **265**: H2017-H2026
- Pinson A, Schlüter K-D, Zhou XJ, Schwartz K, Kessler-Icekson G and Piper HM.** (1993)  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic stimulation in cultured adult ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* **25**: 477-490
- Piper HM, Probst I, Schwartz P, Hütter JF, Spieckermann PG.** (1982) Culturing of calcium stable adult cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* **14**: 397-412
- Piper HM, Volz A and Schwartz P.** (1992) Adult ventricular muscle cells, in. Tissue techniques in heart and vessels research; HM Piper, Editor. *Berlin Heidelberg.* 36-60
- Pollack PS, Houser SR, Budjak R, Goldman B.** (1994) c.myc gene expression is localized to the myocyte following hemodynamic overload in vivo. *J. Cell Biochem.* **54**: 78-84

- Pönicke K, Heinroth-Hoffmann I, Brodde OE.** (2003) Role of  $\beta$ 1- and  $\beta$ 2-adrenoceptors in hypertrophic and apoptotic effects of noradrenalin and adrenalin in adult rat ventricular cardiomyocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* **367**: 592-599
- Powell T, Terrar DA, Twist VW.** (1980) Electrical properties of individual cells isolated from adult rat ventricular myocardium. *J Physiol.* **302**: 131-153
- Prasad MR, Jones RM** (1992) Enhanced membrane protein kinase C activity in myocardial ischemia. *Basic Res Cardiol.* **87**: 19-26
- Price DJ, Grove JR, Calvo V, Ayruch J, Bierer BE.** (1992) Rapamycin-induced inhibition of the 70-kilodalton S6 protein kinase. *Science.* **257**: 973-977
- Puceat M, Hilal-Dandan R, Strulovici B, Brunton LL, Brown JH.** (1994) Differential regulation of protein kinase C isoforms in isolated neonatal and adult rat cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* **269**: 16938–16944
- Pullen N, Dennis PB, Andjelkovic M, Dufner A, Kozma SC, Hemmings BA, Thomas G.** (1998) Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1. *Science.* **279**: 707–710
- Putney LK, Denker SP, Barber DL.** (2002) The changing face of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger, NHE1: structure, regulation, and cellular actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **42**: 527-552
- Remme WJ, Swedberg K.** (2001) Guidelines for the treatment of chronic heart Failure. *Eur Heart J.* **22**: 1527-1560
- Ritchie RH, Marsh JD, Lancaster WD, Diglio CA, Schiebinger RJ.** (1998) Bradykinin blocks angiotensin II-induced hypertrophy in the presence of endothelial cells. *Hypertension.* **31(1)**: 39-44
- Rosenkranz AC, Hood SG, Woods RL, Dusting GJ, Ritchie RH** (2002) Acute antihypertrophic actions of bradykinin in the rat heart – importance of cyclic GMP. *Hypertension.* **40**: 498-503
- Ruf S, Piper HM and Schlüter KD.** (2002) Specific role for the extracellular signal-regulated kinase pathway in angII- but not phenylephrine-induced cardiac hypertrophy in vitro. *Pflügers Arch- Eur J Physiol.* **443**: 483-490
- Rybkin II, Cross ME, McReynolds EM, Lin RZ, Ballou LM.** (2000)  $\alpha$ (1A)-adrenergic receptor induces eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 phosphorylation via a Ca<sup>2+</sup>-dependent pathway independent of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt. *J. Biol. Chem.* **275**: 5460–5465
- Sadoshima J, Jahn L, Takahashi T, Kulik TJ, Izumo S.** (1992) Molecular characterization of the stretch-induced adaption of cultured cardiac cells. *J Biol Chem.* **267**: 10551-60
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N.** (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* **230**: 1350-1354
- Sambrook J, Fritsch E.F. & Maniatis T.** (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY



**Sanger F, Nicklen S und Coulson AR.** (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* **74**: 5463-5467

**Sardet C, Franchi A, Pouyssegur J** (1989) Molecular cloning, primary structure, and expression of the human growth factor – activatable Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Cell.* **56**: 271-80

**Sardet C, Counillon L, Franchi A, Pouyssegur J, Kraft AS, Andersohn WB.**(1990) Growth factors induce phosphorylation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter, a glycoprotein of 110 kD. *Science.* **247**: 723–726.

**Schäfer M, Frischkopf K, Taimor G, Piper HM, and Schlüter K-D.** (2000) Hypertrophic effect of selective  $\beta_1$ -adrenoceptor stimulation on ventricular cardiomyocytes from adult rat. *Am J Physiol Cell Physiol.* **279**: C495–C503.

**Schäfer M, Pönicke K, Heinroth-Hoffmann I, Brodde O-E, Piper HM and Schlüter K-D.** (2001) Beta-Adrenoceptor stimulation attenuates the hypertrophic effect of alpha-adrenoceptor Stimulation in adult rat ventricular cardiomyocytes. *JACC.* **37**(1): 300-307

**Schäfer M, Schäfer C, Piper HM, Schlüter K-D.** (2002) Hypertrophic responsiveness of cardiomyocytes to  $\alpha$ - or  $\beta$ -adrenoceptor stimulation requires sodium-proton-exchanger-1 (NHE-1) activation but not cellular alkalisation. *Eur J Heart failure.* **4**: 249-254

**Schaub MC, Hefti MA, Harder BA, Eppenberger HM.** (1997) Various hypertrophic stimuli induce distinct phenotypes in cardiomyocytes. *J Mol Med.* **75**(11-12): 901-20

**Schlüter K-D & Piper HM.** (1992) Trophic effects of catecholamines and parathyroid hormone on adult ventricular cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **263**: H1739–H1746

**Schlüter K-D, Frischkopf K, Flesch M, Rosenkranz S, Taimor G and Piper HM.** (2000) Central role for ornithine decarboxylase in beta adrenoceptor mediated hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* **45**: 410-417

**Schlüter KD, Goldberg Y, Taimor G, Schäfer M, Piper HM.** (1998) Role of phosphatidylinositol 3-kinase activation in the hypertrophic growth of adult ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* **40**(1): 174-81

**Schlüter K-D, Piper HM.** (1999) Regulation of growth in the adult cardiomyocytes. *FASEB J (Suppl).* **13**: S17-22

**Schlüter K-D, Schäfer M, Balser C, Taimor G, Piper HM.** (1998(A)) Influence of pH and Creatine Phosphate on  $\alpha$ -Adrenoceptor-mediated cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* **30**: 763-771

**Schlüter K-D, Simm A, Schäfer M.** (1999) Early response kinase and PI 3-Kinase activation in adult rat cardiomyocytes and their role in hypertrophy. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol).* **276**: H1655-H1663

**Schlüter K-D, Zhou XJ, and Piper HM.** (1995) Induction of hypertrophic responsiveness to isoproterenol by TGF- $\beta$  in adult rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* **269**: C1311–C1316

- Scholz W, Albus U, Counillon L, et al.** (1995) Protective effects of HOE 642, a selective sodium hydrogen exchange subtype 1 inhibitor, on cardiac ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc Res.* **29**: 260-268
- Scholz W, Albus U, Lang HJ, Linz W, Martorana PA, Englert HC, Schölkens BA.** (1993) HOE 694, a new  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$  exchange inhibitor and its effects in cardiac ischaemia. *Br J Pharmacol.* **109**: 562-568
- Scholz W, Jessel A, Albus U.** (1999) Development of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange inhibitor cariporide as a cardioprotective drug: from the laboratory to the GUARDIAN Trial. *J Thrombosis and Thrombolysis.* **8**: 61-70
- Schrier RW, Abraham WT.** (1999) Hormones and hemodynamics in heart failure. *N Engl J Med.* **341**: 577-585
- Schuler GD.** (1997) Pieces of the puzzle: expressed sequence tags and the catalog of human genes. *J Mol Med.* **75**: 694-698
- Schwarzfeld TA, Jacobson SL.** (1981) Isolation and development in cell culture of myocardial cells of the adult rat. *J Mol Cell Cardiol.* **13**: 563-575
- Seta K, Sadoshima J.** (2003) Phosphorylation of tyrosine 319 of the angiotensin II type 1 receptor mediates angiotensin II-induced trans-activation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem.* **278**(11): 9019-26
- Shah BH & Catt KJ.** (2003) A central role of EGF receptor transactivation in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Trends Pharmacol Sci.* **24**(5): 239-44
- Siddiqui RA, Shaikh SR, Kovacs R, Stillwell W, Zaloga G.** (2004) Inhibition of phenylephrine-induced cardiac hypertrophy by docosahexaenoic acid. *J Cell Biochem.* **92**(6): 1141-59
- Siffert W, Akkerman JWN.** (1989)  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange and  $\text{Ca}^{2+}$  influx. *FEBS Lett.* **259**: 1-4
- Simm A, Schlüter KD, Diez C, Piper HM and Hoppe J.** (1998) Activation of  $\text{p70}^{\text{S6}}$  Kinase by  $\beta$ -adrenoceptor Agonists on Adult Cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* **30**: 2059–2067
- Simpson P, McGrath A, Savion S.** (1982) Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines. *Circ Res.* **51**(6): 787-801
- Simpson P.** (1983) Norepinephrine-stimulated hypertrophy of cultured rat myocardial cells is an alpha 1 adrenergic response. *J Clin Invest.* **72**(2): 732-8
- Simpson P.** (1985) Stimulation of hypertrophy of cultured neonatal rat heart cells through an alpha 1-adrenergic receptor and induction of beating through an alpha 1- and beta 1-adrenergic receptor interaction. Evidence for independent regulation of growth and beating. *Circ Res.* **56**(6): 884-94.
- Smith JA, Poteet-Smith CE, Malarkey K, Sturgill TW.** (1999) Identification of an extracellular signal-regulated kinase (ERK) docking site in ribosomal S6 kinase, a sequence critical for activation by ERK in vivo. *J Biol Chem.* **274**(5):2893-8

**Snabaitis AK, Yokoyama H, Avkiran M.** (2000) Roles of mitogen-activated protein kinases and protein kinase C in  $\alpha(1A)$ -adrenoceptor-mediated stimulation of the sarcolemmal  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$  exchanger. *Circ Res.* **86**(2): 214-20

**Stewart S, et al. (2001).** More “malignant” than cancer? Five-year survival following a first admission for heart failure. *Eur J Heart Fail.* **3**: 315-322

**Steinberg SF, Goldberg M, Rybin VO.** (1995) Protein kinase C isoform diversity in the heart. *J Mol Cell Cardiol.* **27**(1): 141-53

**Steinberg SF.** (1999) The molecular basis for distinct beta-adrenergic receptor subtype actions in cardiomyocytes. *Circ Res.* **85**(11): 1101-11

**Sugden PH, & Clerk A.** (1998) Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *J Mol Med.* **76**(11): 725-46

**Swinghedauw B.** (1990) Cardiac hypertrophy and heart failure. London: Inserm, Libbey Eurotext LTD

**Takahashi E, Abe J, Gallis B, Aebersold R, Spring DJ, Krebs EG, Berk GB.** (1999) p90RSK is a Serum-stimulated  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Exchanger Isoform-1 Kinase - Regulatory phosphorylation of serine 703 of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Exchanger isoform 1. *J Biol Chem.* **274**(29): 20206–20214

**Takayama M, Yoshinori Ebihara Y, Tani M.** (2001) Differences in the Expression of Protein Kinase C Isoforms and Its Translocation After Stimulation With Phorbol Ester Between Young-Adult and Middle-Aged Ventricular Cardiomyocytes Isolated From Fischer 344 Rats. *Jpn Circ J.* **65**: 1071 –1076

**Takewaki S, Kuro M, Hiroi Y, Yamazaki T, Noguchi T, Miyagishi A, Nakahara K, et al.** (1995) Activation of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter (NHE-1) gene expression during growth, hypertrophy and proliferation of the rabbit cardiovascular system. *J Mol Cell Cardiol.* **27**: 729-42

**Talukder MA, Endoh M.** (1997) Pharmacological differentiation of synergistic contribution of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels and  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange to the positive inotropic effect of phenylephrine, endothelin-3 and angiotensin II in rabbit ventricular myocardium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **355**(1): 87-96

**Tanaka H, Nishimaru K, Aikawa T, Hirayama W, Tanaka Y, Shigenobu K.** (2002) Effect of SEA0400, a novel inhibitor of sodium-calcium exchanger, on myocardial ionic currents. *Br J Pharmacol.* **135**(5): 1096-100

**Terzic A, Puceat M, Clement O, Scamps F, Vassort G.** (1992)  $\alpha_1$ -Adrenergic effects on intracellular pH and calcium and on myofilaments in single rat cardiac cells. *J Physiol.* **447**: 275–292

**Tominaga T, Barber DL.** (1998)  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange acts downstream of RhoA to regulate integrin-induced cell adhesion and spreading. *Mol Biol Cell.* **8**: 2287-303

**Towbin H, Staehelin T, Jordon J.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad Sci. USA.* **76**: 4350-4351

- Tsouka V, Markou T, Lazou A.** (2002) Differential Effect of Ischemic and Pharmacological Preconditioning on PKC Isoform Translocation in Adult Rat Cardiac Myocytes. *Cell Physiol Biochem.* **12**: 315-324
- Van Bilsen M, Chien KR.** (1993) Growth and hypertrophy of the heart: towards an understanding of cardiac specific and inducible gene expression. *Cardiovasc. Res.* **27**: 1140-1149
- Vaughan-Jones RD, Wu ML.** (1990) Extracellular  $H^+$  inactivation of  $Na^+-H^+$  exchange in the sheep Purkinje fibre. *J Physiol (Lond).* **428**: 441-446
- Volkl H, Busch GL, Haussinger D, Lang F.** (1994) Alkalinization of acidic cellular compartments following cell swelling. *FEBS Lett.* **338**(1): 27-30
- Wakabayashi S, Fafournoux P, Sardet C.** (1992) The  $Na^+/H^+$  anti-porter cytoplasmic domain mediates growth factor signals and controls 'H' sensing. *Proc Natl Acad Sci USA.* **89**: 2424-8
- Wallert MA, Frohlich O.** (1992)  $\alpha_1$ -Adrenergic stimulation of  $Na^+-H^+$  exchange in cardiac myocytes. *Am J Physiol.* **263**: C1096-1102
- Wang H, Silva NL, Lucchesi PA, Haworth R, Wang K, Michalak M, Pelech S, Fliegel L.** (1997) Phosphorylation and regulation of the  $Na^+/H^+$  exchanger through mitogen-activated protein kinase. *Biochemistry.* **36**(30):9151-8
- Wang L, Wang X, Proud CG.** (2000) Activation of mRNA translation in rat cardiac myocytes by insulin involves multiple rapamycin-sensitive steps. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **278**: H1056-H1068
- Wang L & Proud CG.** (2002) Ras/Erk signaling is essential for activation of protein synthesis by Gq protein-coupled receptor agonists in adult cardiomyocytes. *Circ. Res.* **91**: 821-829
- Wang L & Proud CG.** (2003)  $Ca^{2+}$ -independent protein kinase C activity is required for  $\alpha_1$ -adrenergic-receptor-mediated regulation of ribosomal protein S6 kinases in adult cardiomyocytes. *Biochem. J.* **373**: 603-611
- Wang L, Gout I, Proud CG.** (2001) Cross-talk between the ERK and p70 S6 kinase (S6K) signaling pathways. MEK-dependent activation of S6K2 in cardiomyocytes. *J Biol Chem.* **276**(35): 32670-7
- Wang L, Proud CG.** (2002(A)) Regulation of the phosphorylation of elongation factor 2 by MEK-dependent signalling in adult rat cardiomyocytes. *FEBS Lett.* **531**(2): 285-9
- Waspe LE, Ordahl CP, Simpson PC.** (1990) The cardiac beta-myosin heavy chain isogene is induced selectively in alpha 1-adrenergic receptor-stimulated hypertrophy of cultured rat heart myocytes. *J Clin Invest.* **85**(4): 1206-14
- Weber W, Harnisch L, Jessel A** (2002). Lessons learned from a phase III population pharmacokinetic study of cariporide in coronary artery bypass graft surgery. *Clin Pharmacol&Therapeut.* **71**: Nr.6

- Woo SH, Lee CO.** (1999) Effects of endothelin-1 on  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in guinea pig ventricular myocytes: role of protein kinase C. *J Mol Cell Cardiol.* **31**: 631-43
- Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, Zou Y, Shiojima I, Hiroi Y, Mizuno T, Maemura K, Kurihara H, Aikawa R, Takano H, Yazaki Y.** (1996) Endothelin-1 is involved in mechanical stress-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem.* **271**(6): 3221-8
- Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, Zou Y, Shiojima I, Mizuno T, Takano H, Hiroi Y, Ueki K, Tobe K** (1995) Angiotensin II partly mediates mechanical stress-induced cardiac hypertrophy. *Circ Res.* **77**(2): 258-65
- Yamazaki T, Komuro I, Yazaki Y.** (1998) Signalling pathways for cardiac hypertrophy. *Cell Signal.* **10**(10): 693-8
- Yokoyama H, Yasutake M, Avikran M.** (1998)  $\alpha_1$ -Adrenergic stimulation of sarcolemmal  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  exchanger activity in rat ventricular myocytes: evidence for selective mediation by the  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtype. *Circ Res.* **82**: 1078-85
- Yoshida H, Karmazyn M.** (2000).  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  exchange inhibition attenuates hypertrophy and heart failure in 1-wk postinfarction rat myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **27**: H200-H304
- Zhang CL, McKinsey TA, Chang S, Antos CL, Hill JA, Olson EN.** (2002) Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy. *Cell.* **110**(4): 479-88
- Zheng JS, Boluyt MO, Long X, O'Neill L, Lakatta EG, Crow MT** (1996) Extracellular ATP inhibits adrenergic agonist-induced hypertrophy of neonatal cardiac myocytes. *Circ Res.* **78**(4): 525-35
- Zierhut W, Zimmer HG.** (1989) Significance of myocardial alpha- and beta-adrenoceptors in catecholamine-induced cardiac hypertrophy. *Circ Res.* **65**(5): 1417-25
- Zou Y, Akazawa H, Qin Y, Sano M, Takano H, Minamino T, Makita N, Iwanaga K, Zhu W, Kudoh S, Toko H, Tamura K, Kihara M, Nagai T, Fukamizu A, Umemura S, Iiri T, Fujita T, Komuro I.** (2004) Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II. *Nat Cell Biol.* **6**: 499-506

## **8      Veröffentlichungen**

### **Originalveröffentlichungen**

**Engelhardt S, Hein L, Keller U, Klambt K, Lohse MJ.** (2002) Inhibition of Na(+)-H(+) exchange prevents hypertrophy, fibrosis, and heart failure in beta(1)-adrenergic receptor transgenic mice. *Circ Res.* **90(7)**: 814-9

**Klambt K, Schäfer M, Licher T, Wohlfart P, Busch E.** (2005) Inhibition of the Sodium Calcium Exchanger alters contractility but not hypertrophy of adult rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* Submitted

**Kuester C, Klambt K, Wohlfart P, Dedio J, Busch AE, Ivashchenko Y** (2005) CDNA-array analysis of  $\alpha$ -adrenergic-dependant heart hypertrophy. (*in Arbeit*)

## **9 Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde als externe Doktorarbeit in der Abteilung Cardiovascular Diseases von Aventis in Frankfurt am Main unter der Leitung von Prof. Dr. Andreas E. Busch und Dr. Paulus Wohlfart angefertigt. Mein herzlicher Dank gilt:

Dr. Paulus Wohlfart für die freundliche Unterstützung und kompetente fachliche Beratung der Doktorarbeit.

Prof. Dr. Andreas E. Busch für das Bereitstellen des Themas und des wissenschaftlichen Umfeldes sowie für die Betreuung der Arbeit.

Prof. Dr. Dieter Steinhilber von der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main für die freundliche Betreuung und Begutachtung meiner Arbeit, durch die diese Dissertation erst ermöglicht wurde.

Allen Mitgliedern des Labors von Dr. Wohlfart, insbesondere Claire Chenel, André Markmann und Elke Deckert für die nette Atmosphäre im Labor.

Für die Korrektur meiner Promotionsarbeit und die fachliche Unterstützung, vor allem in methodische Fragen, danke ich Herrn Dr. Carsten Jacobi, der mir ebenfalls jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Matthias Ozog für die Durchführung der DNA-Microchip-Hybridisierung, Dr. Yuri Ivashchenko und Dr. Matthias Schäfer für die gute wissenschaftliche Zusammenarbeit und die interessanten Anregungen.

Claire Chenel, Anke Hullmann, Ursula Stillger, Kerstin Steioff, Dr. Freni Afkham, Cornelia Wihler und Christoph Küster für die hilfsbereite Unterstützung in allen Lebenslagen sowie interessante Diskussionen und Gespräche.

Allen andern Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Meinen Eltern und Geschwistern Britta, Wiebke, Nils und meinem Freund Jochen, die mir viel Geduld und Verständnis während meiner Arbeit entgegengebracht haben, mich das ganze Studium und darüber hinaus unterstützten und immer für mich da waren. Danke für die vielen aufmunternden Worte!

## **Lebenslauf**

### **Angaben zur Person**

Name: Kerstin Klämbt  
Anschrift: Lindenweg 5a; Bremen  
Geburtstag: 20.07. 1974  
Geburtsort: Bremen  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: ledig

### **Ausbildung**

1981-1985 Grundschule in Oberneuland/Bremen  
1985-1991 Ökumenisches Gymnasium/Bremen  
1991-1994 Hermann-Böse-Gymnasium/Bremen  
Abitur 1994  
1994-1997 Studium der Pharmazie an der Hessischen Phillips Universität Marburg,  
1997-1999 Studium der Pharmazie an der Universität Hamburg,  
2. Staatsexamen (1999, Akadem. Lehrer: Prof. Dr. D. Geffken, Prof. Dr. J.B. Mielck, Prof. Dr. M. Korth, Prof. Dr. KH. Kubetschka)  
05/1999 – 11/1999 Diplomarbeit an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald unter der Leitung von Prof. Dr. H.K. Krömer, mit dem Titel: „Untersuchungen zur Expression Peptidprodrug-aktivierender Enzyme“  
3. Staatsexamen und Approbation zur Apothekerin im Juli 2000. Seit 06/2001 Anfertigung der vorliegenden Dissertation in der Abteilung Cardiovascular Diseases der Aventis Pharma Deutschland GmbH in Frankfurt am Main unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. A. E. Busch und Herrn Prof. Dr. D. Steinhilber

### **Praktika**

03/1995 Famulatur in der St.Gotthard-Apotheke, Bremen  
08/1995 Famulatur in der St.Gotthard-Apotheke, Bremen  
05/1999 - 11/1999 Diplomarbeit an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald  
12/1999 – 05/2000 Pharmaziepraktikum in der Apotheke Sauter, Singen

### **Auslandsaufenthalte**

01/1991 – 04/1991: Schulbesuch am Colegio Alemán in Madrid, Spanien

### **Praktische Tätigkeiten**

06/2000 – 09/2000 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Arbeitskreis Prof. U. Holzgrave  
10/2001 – 05/2001 Angestellte in der St.Gotthard-Apotheke, Bremen



## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Kerstin Klämbt, geboren am 20.07.1974 in Bremen, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Titel „*Untersuchung zur Wirkung und Wirkmechanismus von NHE-1-Inhibitoren auf die Hypertrophie adulter Rattenkardiomyozyten*“ selbständig angefertigt und keine anderen Quellen oder Hilfsmittel als die hier angegeben benutzt habe. Ich habe bisher an keiner anderen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main, den 11.03.2005